Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

EINFLUSS VON INTESTINALEN KARZINOGENEN AUF DIE FREMDSTOFFABBAUENDE ENZYM–AKTIVITÄT DES DÜNNDARMS DER RATTE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von

EDITH AIGNER - HÖTTE geb. Aigner
aus Heidenheim

1982

Aus der Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. W. Dölle
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

EINFLUSS VON INTESTINALEN KARZINOGENEN AUF DIE FREMDSTOFFABBAUENDE ENZYM–AKTIVITÄT DES DÜNNDARMS DER RATTE

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
EDITH AIGNER - HÖTTE geb. Aigner
aus Heidenheim

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr.med. K. Voigt
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. med. H. P. Hoensch
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. A. Wendel

---

gedruckt bei H.- J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	2
2. METHODIK	6
2.1. Versuchstiere	6
2.1.1. Versuchstierhaltung	6
2.1.2. Futter und Fütterung	6
2.1.3. Töten der Versuchstiere und Probengewinnung	7
2.2. Mikrosomenpräparation	8
2.2.1. Rattendünndarm	8
2.2.2. Rattenleber	9
2.3. Chemikalien	9
2.4. Bestimmung der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase in Rattendarmmikrosomen	10
2.5. Bestimmung der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase in Rattenlebermikrosomen	13
2.6. Bestimmung der NADPH-Cytochrom C-Reduktase	14
2.7. Bestimmung der Naphthol-Glucuronyltransferase	16
2.8. Bestimmung von Cytochrom P-450	18
2.9. Bestimmung von Cytochrom b_5	19

Seite

2.10. Proteinbestimmung 20

2.11. Statistische Auswertung 22

3. ERGEBNISSE 23

3.1. 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase 23

3.1.1. Abhängigkeit der spez. EOD-Aktivität von der Proteinkonzentration der mikrosomalen Suspension 23

3.1.2. Abhängigkeit der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylierung von der Inkubationszeit 24

3.2. NADPH - Cytochrom C-Reduktase 25

3.2.1. Proteinabhängigkeit 25

3.3. 1-Naphthol-Glucuronyltransferase 26

3.3.1. Proteinabhängigkeit der 1-Naphthol-Glucuronidierung 26

3.3.2. Zeitabhängigkeit der 1-Naphthol-Glucuronidierung 27

3.3.3. Einfluß verschiedener Brij-Konzentrationen auf die spez. Aktivität der Naphthol-Glucuronyltransferase 28

3.4. Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 29

3.4.1. Proteinabhängigkeit von Cytochrom P-450 29

3.4.2. Proteinabhängigkeit von Cytochrom b_5 30

3.5. Versuch der Bestimmung von PNA in Rattendünndarmmikrosomen 30

3.6. Wiedergewinnungsraten in Rattendünndarmmikrosomen 31

3.7. Reaktion der Enzymaktivitäten im Rattendünndarm auf unterschiedliche Diätformen 32

3.8. Einflüsse des Karzinogens DMH 33

Seite

3.8.1. - auf die Futteraufnahme der Versuchstiere (Abb.9) 33

3.8.2. - auf die Entwicklung des Körpergewichts von Versuchs- und Kontrolltieren (Abb.10) 34

3.8.3. - auf den mikrosomalen Proteingehalt in Leber-und Darmgewebe 36

3.9. Reaktion des Monooxygenase-Systems und der Naphthol-Glucuronyltransferase auf die Gabe von DMH im Zeitablauf 37

3.9.1. 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase 37

3.9.2. Reduktase und Cytochrom b_5 39

3.9.3. Cytochrom P-450 (Abb.16) 40

3.9.4. Naphthol-Glucuronyltransferase (Abb.17) 42

3.10. Reversibilität und Spezifität der Karzinogenwirkung 42

3.11. Histologie 43

4. DISKUSSION 46

4.1. Bewertung der Methoden 46

4.2. Diätform und fremdstoffabbauende Enzyme 50

4.3. Verhalten der Enzyme bei Karzinogengabe 52

5. ZUSAMMENFASSUNG 56

6. LITERATURVERZEICHNIS 58

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Abb. 1: EOD-Aktivität in Abhängigkeit vom Proteingehalt der mikrosomalen Suspension (Mittelwerteaus Doppelbestimmungen)

Abb. 2: EOD-Aktivität der 10% mikrosomalen Suspension in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Abb. 3: Abhängigkeit der NADPH-Cytochrom C-Reduktase in Rattendünndarmmikrosomen von der Proteinmenge der mikrosomalen Suspension.

Abb. 4: 1-Naphtholglucuronidierung in Abhängkeit von der mikrosomalen Proteinmenge (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Abb. 5: 1-Naphtholglucuronidierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen in 15% mikrosomaler Suspension)

Abb. 6: Einfluß verschiedener Brij-Konzentrationen auf die spez. Aktivität der Glucuronyltransferase der 20% mikrosomalen Suspension (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Abb. 7: Cytochrom P-450 Gehalt in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der mikrosomalen Proteinkonzentration

Abb. 8: Cytochrom b_5 Gehalt in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der mikrosomalen Proteinkonzentration

Abb. 9: Futteraufnahme mit und ohne DMH in der Diät

Abb.10: Gewichtsentwicklung von Versuchs- und Kontrolltieren

Abb.11: Häufigkeitsverteilung der Proteinwerte in der Mikrosomenfraktion des Darmgewebes

Abb.12: Spez. EOD-Aktivität in Rattendarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab.6)

Fortsetzung
VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Abb.13: Spez. EOD-Aktivität in Rattenlebermikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab.7)

Abb.14: Spezifische Reduktaseaktivität in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab.6)

Abb.15: Cytochrom b_5 Gehalt in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab.6)

Abb.16: Gehalt der Rattendünndarmmikrosomen an Cytochrom P-450 in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab.6)

Abb.17: Spez. Aktivität der Naphthol-Glucuronyltransferase in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl.Tab.6)

Tab. 1: Wiedergewinnungsraten von EOD, Reduktase, N-GT und des Proteins im 9 000 g Überstand und den Mikrosomen

Tab. 2: Spez. Aktivität von EOD, Reduktase und N-GT im Homogenat, 9 000 g Überstand und den Mikrosomen

Tab. 3: Einfluß der Diätform auf die Maßparameter in Rattendünndarmmikrosomen

Tab. 4: Einfluß von DMH auf die Futteraufnahme

Tab. 5: Gewichtsentwicklung von Kontroll- und Versuchstieren bei DMH-Fütterung

Tab. 6: Spezifische Aktivität und Gesamtaktivität von EOD- Glucuronyltransferase, Reduktase, Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 in Rattendünndarmmikrosomen bei Verfütterung der semisynthetischen Diät C 1000 ohne DMH (Kontrollwert) und mit DMH nach unterschiedlich langer Fütterungsdauer

Tab. 7: Spezifische Aktivität und Gesamtaktivität von EOD, Glucuronyltransferase, Reduktase, Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 in Rattenlebermikrosomen nach Verfütterung der semisynthetischen Diät C 1000 ohne DMH (Kontrollwert) und mit DMH nach unterschiedlich langer Fütterungsdauer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DENA	Diäthylnitrosamin
DMH	1,2 Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EOD	7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase
N-GT	Naphtol-Glucuronyltransferase
n	Anzahl der Stichproben
P	Protein
p	Signifikanzniveau
PNA	para-Nitroanisol-O-Demethylase
Reduktase	NADPH-Cytochrom C Reduktase
SNT	Überstand (supernatant)
UDPGA	UDP-Glucuronsäure
w.w.	Feuchtgewicht (wet-weight)

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

In den letzten Jahrzehnten hat die Wahrscheinlichkeit, an Karzinomen des Intestinaltraktes zu erkranken, deutlich zugenommen (PARKASCH, 1974). In Europa war der Kolonkrebs 1975 nach dem Bronchial- und Magenkarzinom die dritthäufigste Ursache der Krebssterblichkeit (ROTTER, 1975). Die Gründe dieser Zunahme sind noch nicht eindeutig bekannt, genetische Faktoren sind jedoch wenig wahrscheinlich (HOENSCH, 1977). In den neueren Arbeiten wird vornehmlich auf die Rolle von Umwelteinflüssen hingewiesen. Dabei wird einmal die veränderte Ernährungsweise diskutiert (PHILLIPS, 1975) und zum anderen der erhöhte Fremdstoffgehalt der heutigen Nahrung. Diese Fremdstoffe sind in der überwiegenden Mehrzahl Arzneimittel, aber auch Konservierungsstoffe (Biphenyl, Phenol, im weiteren Sinne auch Benzpyren), industrielle Abfallprodukte (Benzol, Naphthol,Teerprodukte), sowie natürlich vorkommende Karzinogene wie Aflatoxin B_1 (ROGERS, 1975), Cycasin (LAQUER, 1963) und Hydrazine (TOTH, 1975). Sie alle treffen nach der Nahrungsaufnahme als erstes auf die Oberflächenepithelzellen des Verdauungstraktes. Es ist zwar noch nicht mit Sicherheit erwiesen, daß einige von ihnen im Darm Karzinome erzeugen, im Tierexperiment kann man jedoch mit chemisch ähnlich strukturierten Verbindungen Tumoren induzieren. Eine dieser Substanzen ist 1,2 Dimethylhydrazin. Es ist ein fast selektives intestinales Karzinogen (DRUCKREY, 1967) und erzeugt im Tierversuch dieselben Tumoren, wie sie im menschlichen Darm beobachtet werden (WIEBECKE, 1973). Am Beginn steht eine Mukosahyperplasie mit anschließendem Differenzierungsverlust bis hin zum völlig entdifferenzierten Adenokarzinom. Auch die Tumorverteilung entlang des Darmtraktes gleicht der beim Menschen, mit einer starken Bevorzugung des Dickdarms. Bei niedriger Dosierung des Karzinogens findet man im Dünndarm nur ausnahmsweise Tumoren (WARD, 1973). Offensichtlich ist die karzinogene Schwelle im Dünndarm höher als im Dickdarm. Was unterscheidet aber diese beiden Darmabschnitte so entscheidend, daß es im einen Teil zur Karzinogenese kommt, im anderen dagegen nicht? Darüber wurden mehrere Hypothesen aufgestellt:

1. Der Dünndarminhalt ist wesentlich flüssiger, die mechanischen Irritationen der Mukosa daher geringer (CALMAN, 1974).

2. Der Dünndarminhalt ist gegenüber dem des Dickdarms relativ steril, damit ist die Bildung von Karzinogenen durch enterale Darmbakterien, besonders durch Cl. paraputrificum (HILL, 1974), weitgehend unterbunden.

3. Die Passagezeit im Dünndarm ist wesentlich kürzer, es kommt also zu einem weniger langen Kontakt mit dem karzinogenen Agens (CALMAN, 1974).

4. Die Immunitätslage beider Darmabschnitte ist verschieden (CALMAN,1974).

5. Die Aktivität des fremdstoffabbauenden Monooxygenase-Systems der Epithelzellen nimmt vom Pylorus ausgehend entlang des Darms ab (HOENSCH, 1976).

Das mischfunktionelle oder Monooxygenase-Enzymsystem ist eine komplexe biochemische Einheit, lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Es wurde erstmals in der Leber untersucht, konnte jetzt aber - wenngleich in wesentlich geringerer Aktivität - auch im Dünndarm, der Lunge, der Haut und der Placenta (JACOBSEN, 1974) nachgewiesen werden. Es ist also jeweils an Stellen des Körpers lokalisiert, die als Barrieren eine Schutzfunktion ausüben könnten. Durch die oxidative Biotransformationsreaktion des Monooxygenase-Systems werden lipophile Substanzen im Körper zu wasserlöslichen Derivaten umgebaut und können so über Galle oder Niere ausgeschieden werden. Dabei kann das Produkt der Enzymreaktion unschädlich sein, aber auch giftig oder karzinogen.

Die enzymatische Reaktion folgt der Gleichung:

$$R\text{-}CH_3 + O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow[P\text{-}450]{\text{Flavinenzym}} R\text{-}CH_2OH + H_2O + NADP^+$$

(REMMER, 1967).

Im Mittelpunkt dieses Systems steht Cytochrom P-450. Es nimmt in der Fe (II) Form ein Sauerstoffmolekül auf. Durch Valenzaustausch entsteht die Fe (III)-O-O^- Form, die unter Elektronenaufnahme ein OH^- abgeben kann. An diesem Komplex ist der Sauerstoff aktiviert, sodaß er in die C-H-Bindung eingefügt werden kann (CARLSON, 1972). Danach muß das Fe (III) wieder zu Fe (II) reduziert werden. Diese Reaktion wird durch die Reduktase, einem unspezifischen Enzym katalysiert. Wasserstoffdonator ist NADPH + H^+. Der hydroxylierte Fremdstoff kann nun weiteren Abbau- und/oder Ausscheidungsmechanismen wie z.B. der Glucuronidierung zugeführt werden.

Es gibt nun mehrere Anhaltspunkte dafür, daß dieses Enzymsystem möglicherweise eine krebsabwehrende Rolle im Dünndarm spielen kann:

1. Tumoren entstehen häufiger in Darmabschnitten, in denen keine oder eine mit den bisher eingesetzten Methoden nicht meßbare Monooxygenase-Aktivität vorhanden ist (HOENSCH, 1975).

2. Im Dünndarm sind zur Krebsentstehung größere Mengen an Karzinogen erforderlich, als im Dickdarm (WARD, 1973).

3. Wird 1,2 Dimethylhydrazin in einer ungereinigten Diät, die das Monooxygenase-System aktivieren kann, verabreicht, so ist die Tumorrate niedriger als bei Verfütterung von 1,2 Dimethylhydrazin in einer semisynthetischen Diät (REDDY, 1975).

4. Bei einseitiger Ernährung, wie z.B. bei Vitamin A Mangel, Ballaststoffmangel, hohem tierischem Fettgehalt mit einer Erniedrigung der lipotropen Substanzen (ROGERS, 1973, 1975), entstehen häufiger Tumoren, möglicherweise durch Alteration des mikrosomalen Monooxygenase-Systems (CAMPELL, 1974).

5. Die chemisch induzierbaren Tumoren gehen meist von den Cryptzellen aus (WIEBECKE, 1973), die einen niedrigeren Monooxygenasegehalt haben (HOENSCH, 1976).

In der vorliegenden Arbeit soll das Monooxygenase-System in Rattendünndarmmikrosomen unter dem Einfluß eines intestinalen Karzinogens untersucht werden. Die Versuche sollen dazu beitragen herauszufinden, welche Mechanismen das fremdstoffabbauende Enzymsystem des Dünndarms kontrollieren und welche physiologische Rolle dieses biologische System spielt. Dazu wurden die Normalwerte von EOD, Reduktase, Cytochrom P-450 und b_5 ermittelt und ihre Veränderungen bei Verfütterung von 1,2 Dimethylhydrazin in semisynthetischer Diät beobachtet. Um Hinweise auf einen Zusammenhang von Fremdstoffoxidation und Fremdstoffglucuronidierung zu erhalten, wurde zusätzlich unter gleichen Bedingungen die Naphthol-Glucuronyltransferase-Aktivität gemessen.

2. METHODIK

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Versuchstierhaltung

Sämtliche Tierversuche wurden mit männlichen Sprague-Dawley Ratten aus der Zucht Ivanovas/Kissleg durchgeführt. Das Ausgangsgewicht der Tiere betrug durchschnittlich 220 g; während allen Versuchen nahmen die Tiere an Gewicht zu.

Um die Versuchsergebnisse möglichst wenig durch Umwelteinflüsse zu verfälschen, wurden die Tiere unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Temperatur des Tierraumes wurde durch eine Klimaanlage geregelt und betrug 21 $\pm$ 2° C, die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 und 60%. Die Lichtverhältnisse entsprachen dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus. Während der Versuchszeit wurden je 4 Ratten in einem Edelstahl-Drahtkäfig gehalten.

Pestizide wurden im Tierraum nicht verwendet.

2.1.2. Futter und Fütterung

Für die Verfütterung des Karzinogens 1,2 Dimethylhydrazin (DMH) (Ega-Chemie, Steinheim/Albuch) wurde die semisynthetische Diät C 1000 (Altromin, Lage/Lippe) verwendet. Die Diät enthielt 300 mg DMH/kg (ROGERS, 1973).

Zusammensetzung in % der Diät:

- Casein 22
- Stärke 53 (Mais)
- Saccharose 10
- Sojaöl 3
- Cellulosepulver 4
- Vitaminmischung 3
- Mineralstoffe und Spurenelemente 6

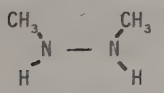
Die umsetzbare Energie betrug 3,3 Kcal/g.

In allen anderen Versuchen wurde die Rattenstandarddiät 1310 (Altromin, Lage/Lippe) verfüttert. Zusammensetzung in % der Diät:

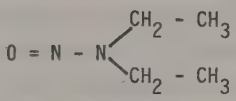
Rohprotein 23
Rohfett 5
Rohfaser 4.5
N-freie Extraktstoffe 47,5
Asche 6,5

Die umsetzbare Energie betrug 3,25 Kcal/g.

Das Futter wurde ausschließlich in pelletierter Form und ebenso wie Wasser während der gesamten Versuchszeit ad libitum angeboten. Das Karzinogen Diäthylnitrosamin (Schuchardt, München) wurde den Tieren ins Trinkwasser (3 mg/kg Ratte/Tag) gegeben (ELTZE, 1977). Die Fütterung erfolgte jeden Tag morgens gegen 8 Uhr.



1,2 Dimethylhydrazin (DMH)



Diäthylnitrosamin (DENA)

2.1.3. Töten der Versuchstiere und Probengewinnung

Zur Entnahme von Darm und Leber wurden die Tiere morgens zwischen 6 und 7 Uhr mit Äther betäubt und durch Einschneiden der Aorta abdominalis ausgeblutet (HOENSCH, 1976). Beginnend am Pylorus wurde ein 15 cm langes Dünndarmsegment entnommen und sofort kräftig mit 2 x 50 ml eiskalter 1,15% KCl-Lösung durchgespült. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Darmstücke in kaltem 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 aufbewahrt. Zur Gewinnung von genügend Untersuchungsmaterial mußten die Darmsegmente von jeweils 4 Ratten gepoolt werden.

Die Lebern der Tiere wurden durch die vena cava superior mit ungefähr 10 ml 1,15% KCl-Lösung perfundiert und in kalten 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 gelegt.

Alle folgenden Verarbeitungsschritte wurden bei + 4° C im Kühlraum durchgeführt.

2.2. Mikrosomenpräparation

2.2.1. Rattendünndarm

Die in kaltem 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4, liegenden Dünndarmsegmente wurden auf Filterpapier gelegt und vorsichtig abgetupft. Danach wurde der Darm entlang der Mesenterialgefäßlinie aufgeschnitten, auf einer Glasplatte ausgebreitet und mit einem Metallspatel vorsichtig die obere Zellschicht abgeschabt. 15 cm Darm ergaben ungefähr 250 mg Feuchtgewicht (HOENSCH, 1976). Das Geschabsel wurde gewogen, daraus durch Homogenisieren eine 20% Suspension (200 mg Feuchtgewicht/ml) mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 hergestellt. Die Homogenisation erfolgte maschinell in einem Glas-Teflon-Homogenisator (enges Spiel) durch 15-maliges Auf-und Abwärtsbewegen des Glasgefäßes. Zum weiteren Aufschluß wurde das 20% Homogenat ultrabeschallt (Branson Sonic Power Comp., Sonifier B-12, 20 s, 1 microtip ≙ 20 Watt). In der anschließenden Zentrifugation (Sorvallzentrifuge RC-5, 10 min, 4° C, 12750 rpm ≙ 20 000 x g) wurden die großen Zelltrümmer (Kerne, Mitochondrien) abzentrifugiert und durch Verwerfen des Pellets ein klarer 20 000 g Überstand (SNT) gewonnen. Der Überstand wurde in einer Beckmann Ultrazentrifuge L-40, 1 Stunde bei 40 000 rpm ≙ 104 000 x g zentrifugiert, damit sich die Mikrosomen als Pellet anreichern. Die so erhaltenen Mikrosomen wurden 1 mal mit 1,15 % KCl-Lösung gewaschen, um das noch enthaltene Hämoglobin zu entfernen. Danach wurde erneut 30 min bei 104 000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Cytoplasmaanteilen wurde verworfen, der entstandene Mikrosomenpellet mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 resuspendiert und in einem Glas-Glas-Homogenisator durch 15 Stöße rehomogenisiert.

2.2.2. Rattenleber

Das Lebergewebe wurde ebenfalls zwischen Filterpapier trockengetupft, dann manuell durch 25-30 Stöße in einem Glas-Glas-Homogenisator mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 ein 10% Homogenat (100 mg Feuchtgewicht/ml) hergestellt. Für den weiteren Aufschluß wurde 20 s mit 1,5 microtip ≙ 30 Watt beschallt. Die erste Zentrifugation erfolgte in der Sorvall-Zentrifuge RC-5 (8750 rpm, 4° C, 10 min) und führte zu einem 9 000 g Überstand.

Die weiteren Schritte zur Mikrosomengewinnung waren identisch mit denen des Darmgewebes.

Die so entstandenen Mikrosomensuspensionen wurden für die nachfolgenden Bestimmungen verwendet. Die Zeitspanne vom Töten der Versuchstiere bis zum Beginn der Enzymbestimmungen, war nie länger als 5 Stunden.

2.3. Chemikalien

Behringwerke, Marburg
Rinderserumalbumin, trocken, Reinheitsgrad 100%.

Boehringer, Mannheim
Nicotinamid - adenin - dinucleotidphosphat reduziert
(NADPH) Grad II
Uridin - 5 - diphospho - glucuronat
(UDPGA) Dinatriumsalz

Ega-Chemie, Steinheim
N,N'-Dimethylhydrazin (sym) Dihydrochlorid (DMH)
MG 133,02

Radiochemical Center, Amersham
^{14}C - 1 - Naphthol
(50 µCi/ml), spez. Aktivität 10-20 mCi/mmol

Schuchard, München
N-Nitroso-diäthylamin (DENA) MG 102,14

Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Brij 58

Sigma Chemicals, St. Louis
oxid. Cytochrom C Typ III aus Rinderherz

Zinsser, Frankfurt
Dimethyl - POPOP
1,4 - Di (2-(4 methyl- 5 - phenyloxazolyl)) Benzol
PPO
2,5 Diphenyloxazol

7-Äthoxycumarin wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. V. Ullrich, Homburg/Saar zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt.

2.4. Bestimmung der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase in Rattendarmmikrosomen

Die hier verwendete Methode zur Bestimmung der EOD in Rattendarmmikrosomen wurde von SCHMID (Dissertation in Vorbereitung) übernommen, deren 1977 entwickelte Methode sich an die von JACOBSON et. al. 1974 beschriebene anlehnt. Sie basiert auf den Fluoreszenzeigenschaften der Cumarinderivate. Um die Empfindlichkeit der Methode zu steigern und umd die beiden fluoreszierenden Substanzen (7-Äthoxycumarin und Umbelliferon) exakt zu trennen, wurde ein Dünnschichtchromatogra phieschritt eingeführt.

Lösungen:

1. 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4

2. 1 mM 7-Äthoxycumarin in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4, das 15 min mit O_2 begast wird (0,191 mg/ml).

3. 5 x 10^2 M NADPH in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 (41,17 mg/ml)

4. Diäthyläther p.a.

5. Aceton uvasol

6. Fließmittel: Toluol p.a.: Aceton uvasol 95 : 5 (v/v).

Bestimmungssatz:

a. Inkubation

	Leerwert (ml)	Probe (ml)
1 mM 7-Äthoxycumarin	0,250	0,250
Probe (10-20% Rattendarm-mikrosomen)	--	0,250
0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,4	0,250	--
starten der Reaktion mit		
5 x 10^{-2} M NADPH	0,005	0,005
Inkubation der Proben bei 37° C im Schüttelbad. Der Leerwert bleibt in Eis stehen. Nach 20 min stoppen der Reaktion durch Zugabe von		
Diäthyläther p.a.	2,500	2,500

b. Dünnschichtchromatographie:

5 min Extraktion von Proben und Leerwert im Rundlauf, anschließend Zentrifugation bei 1600 rpm und 4° C zur Phasentrennung.

Die Cumarinderivate sind in der organischen Phase angereichert, von der jeweils 2 ml in Reagenzgläser überführt werden. Der Äther wird im Wasserbad abgedampft.
Der Rückstand wird in 0,03 ml Aceton uvasol aufgenommen und davon 0,01 ml auf eine ITLC - Gelman SA Platte aufgetragen (Gelman Instrument Comp. Ann Arbor Michigan).

Fließmittel:	Toluol : Aceton 95 : 5 (v/v)
Temperatur:	Zimmertemperatur
Äquilibrationszeit:	Kammer 10 min
	Kammer und Platte 10 min
Laufzeit:	20 min

Nach Trocknen der Platte werden die Umbelliferonorte mit einer UV-Lampe (λ = 366 nm) lokalisiert und gekennzeichnet (Rf: 7-Äthoxy-cumarin 0,95, Rf: Umbelliferon 0,33).

c. Extraktion:

Die ausgeschnittenen Umbelliferonorte (ungefähr 1 cm^2) werden mit 2 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 5 min im Rundlauf extrahiert und nach Zugabe von 5 ml Äther nochmals 5 min im Rundlauf behandelt. Von der organischen Phase werden 4 ml in Reagenzgläser überführt und der Äther wird abgedampft. Zur Messung wird der Rückstand in 1 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 aufgenommen.

d. Messung:

Die Messung erfolgt am Aminco-Bowman Spektrofluormeter (Exitation 338 nm, Emission 458 nm) gegen 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 als Nullwert. Die relative Intensität des Leerwertes wird von den gemessenen Probenwerten abgezogen.

e. Berechnung der Enzymaktivität

$$\frac{y \times f_1}{a \times t \times P} = \text{pMol/min/mg Protein}$$

y	=	relative Fluoreszenzintensität
t	=	Inkubationszeit (min)
f_1	=	Verdünnungsfaktor (18,75)
a	=	Steigung der Standardkurve (a = 0,206; d.h. 1 pmol/ml ≙ 0,206 rel. Fluoreszenzintensität)
P	=	Proteingehalt pro ml der verwendeten Mikrosomensuspension

2.5. Bestimmung der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase in Rattenlebermikrosomen

Dieser fluorometrische Test wurde von ULLRICH und WEBER 1972 als schnelle, zuverlässige und empfindliche Methode zur Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität in Lebermikrosomen beschrieben. Die Bestimmung der EOD beruht auf der O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin zum stark fluoreszierenden Umbelliferon.

$$\text{7-Äthoxycumarin} + \text{NADPH} + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{EOD}} \text{Umbelliferon} + CH_3\text{-CHO} + H_2O + NADP^+$$

Lösungen:

1. 0,1 M Tris - HCl - Puffer, pH 7,6

2. 1 mM 7-Äthoxycumarin in 0,1M Tris- HCl - Puffer, pH 7,6. Diese Lösung muß ungefähr 20 min begast werden, um eine optimale O_2-Sättigung zu erreichen (0,191 mg/ml).

3. 10 mM NADPH in 0,1 M Tris - HCl - Puffer, pH 7,6 (8,33 mg/ml).

Bestimmungsansatz:

0,250 ml 1 mM 7-Äthoxycumarin (2.)
0,250 ml 1% Lebermikrosomenlösung

in eine Quarzküvette (Schichtdicke 5 mm) pipettieren, mischen und 5 min bei 37° C äquilibrieren lassen. Am Ende der 5. Minute wird die Nullinie registriert. Danach Zugabe von

0,005 ml 10 mM NADPH (3.),

Küvetteninhalt mischen und im Aminco-Bowman Spektrofluorometer (Exitation 380 nm, Emission 450 nm) die Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 450 nm über einen Zeitraum von 5 min registrieren.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\frac{E \times 100 \times f_1}{t \times 23{,}51 \times P} = \text{pMol/min/mg Protein}$$

E = Fluoreszenzzunahme innerhalb von 5 Minuten
f_1 = Verdünnungsfaktor (bei 0,25 ml Probe = 4)
t = Zeitfaktor (=5, da das Ergebnis pro Minute angegeben)
P = Proteingehalt der verwendeten Mikrosomensuspension

Der Wert 100/23,51 ergibt sich aus der Eichkurve des Umbelliferons. Beim Einsatz von 100 pMol/0,5 ml wurde ein Anstieg von 23,51 rel. Fluoreszenzeinheiten gemessen.

2.6. Bestimmung der NADPH-Cytochrom C-Reduktase

Die NADPH-Cytochrom C-Reduktase wurde nach der von WILLIAMS und Mitarbeiter 1961 veröffentlichten Methode bestimmt. Ihr liegt folgendes Prinzip zugrunde: oxydiertes Cytochrom C wird im Beisein von NADPH durch die NADPH-Cytochrom C-Reduktase in reduziertes Cytochrom C umgewandelt. Die Bildung des reduzierten Produkts wird durch

Absorptionszunahme bei 550 nm sichtbar. Die Reaktion verläuft für mindestens 5 min zeitlinear.

Lösungen:

1. 0,05 M Kalium - Phosphat - Puffer pH 7,4

2. 0,15 M oxidiertes Cytochrom C Typ III in 0,05 M Kalium - Phosphat - Puffer pH 7,4 (1,42 mg/ml)

3. 3 mM KCN in 0,05 M Kalium - Phosphat - Puffer pH 7,4 (19,5 mg/ml)

4. 0,01 M NADPH in 0,1 M Kalium - Phosphat - Puffer pH 7,4 bei Darmmikrosomenlösung oder in 0,1 M Tris - HCl - Puffer pH 7,6 bei Lebermikrosomenlösung (8,33 mg/ml)

Bestimmungsansatz:

0,1 ml Lösung 1
0,2 ml Lösung 2
0,2 ml Lösung 3
0,1 ml Probe (5% Darmmikrosomenlösung oder 1% Lebermikrosomenlösung)

in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) pipettieren und bei 37° C 7 min äquilibrieren. Am Ende der 7. min wird die Nullinie geschrieben. Danach Starten der Reaktion durch Zugabe von 10 µl der Lösung 4 und Aufzeichnen der Absorptionsänderung im Doppelwellenlängenverfahren mit einem Aminco DW 2 Spektrophotometer.

Meßwellenlänge: 550 nm
Referenzwellenlänge: 504 nm

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\frac{(m-m_o) \times k \times f_1}{P} = \text{nMol/min/mg Protein}$$

m = Anstieg der Extinktion in der 1. Minute nach NADPH Zugabe
m_o = Anstieg der Nullinie in der 1. Minute
k = Absorptionskoeffizient (21 mM^{-1} cm^{-1})
f_1 = Verdünnungsfaktor (1% Lösung = 10, 5% = 2)
P = Proteingehalt pro ml der verwendeten Mikrosomensuspension

2.7. Bestimmung der Naphthol-Glucuronyltransferase

Die Bestimmung der Naphthol-Glucuronyltransferase erfolgte nach einer von BOCK und WHITE 1974 entwickelten Methode, die 1978 von HUBER (Dissertation, Universität Tübingen 1978) modifiziert wurde. Sie basiert auf folgender Umsetzung:

$$^{14}C\text{-1-Naphthol} + UDPGA \xrightarrow{N\text{-}GT} {}^{14}C\text{-1-Naphtholglucuronid} + UDP$$

Nach abgelaufener Reaktion wird das nicht umgesetzte wasserunlösliche ^{14}C-1-Naphthol mit Chloroform ausgeschüttelt, das gebildete wasserlösliche Glucuronid bleibt in der wässrigen Phase zurück und kann durch Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler (Betaszint BF 5 000) bestimmt werden.

Lösungen:

1. 50 mM $MgCl_2$
2. 5 mM 1-Naphthol (7,2 mg 1-Naphthol in 0,2 ml DMSO lösen und mit aqua dest. auf 10 ml auffüllen)
3. ^{14}C-1-Naphthol (0,62 µCi/ml)
   50 µl Stammlösung (50 µCi/mo) + 0,4 ml DMSO + 3,6 ml aqua dest.
4. 0,5% Brij 58 (wässrige Lösung)
5. 0,1 M Kalium - Phosphat - Puffer, pH 7,4
6. 0,1 M Tris - HCl - Puffer, pH 7,6
7. 30 mM UDPGA in aqua dest. (24 mg/ml)
8. Glycin - TCA - Puffer, pH 2,2
   (0,6 M Glycin und 0,4 M TCA in aqua dest.)
9. Bray'scher Szintillator (BRAY 1960)
   (30 g Naphthalin, 1,99 g PPO, 0,2 g POPOP, 50 ml Methanol, 10 ml Äthylenglykol, 440 ml Dioxan)

Bestimmung:

	Leerwert (ml)	Probe (ml)
0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 (Darmmikrosomen) oder 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 (Lebermikrosomen)	0,05	0,05
50 mM $MgCl_2$	0,05	0,05
5 mM 1-Naphthol	0,05	0,05
^{14}C-1-Naphthol (ca. 1 µCi/ml)	0,05	0,05
0,5% Brij 58	0,05	0,05
H_2O	0,05	----
Probe (20% Darmmikrosomen oder 5-10% Lebermikrosomen)	0,20	0,20
in Schüttelbad bei 37° C 3 min vorinkubieren; dann Starten der Reaktion durch Zugabe von		
30 mM UDPGA	---	0,05
10 min bei 37° C im Schüttelbad inkubieren; stoppen der Reaktion mit		
Glyzin - TCA - Puffer pH 2,2	0,50	0,50

schütteln und zur besseren Proteinfällung 10 min in ein Eisbad stellen.
Danach 3 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5412 bei 12 000 rpm das gefällte Protein abzentrifugieren.
Den gesamten Überstand in ein Reagenzglas überführen, in dem 8 ml Chloroform vorgelegtwurden, 30 s schütteln, Phasentrennung durch 10 min Zentrifugation in einer Stock Zentrifuge 2890 Stufe 6.
Vom wässrigen Überstand 0,2 ml entnehmen und mit 5 ml Bray'schem Szintillator versetzen; im Szintillationszähler messen.

Standard: 0,05 ml ^{14}C-1-Naphthol in 5 ml Bray.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\frac{(cpm - cpm_o) \times g_o \times f_1}{cpm_{St} \times t \times P} = \text{nMol/min/mg Protein}$$

cpm = Zählausbeute der Probe
cpm_o = Zählausbeute des Leerwerts
cpm_{St} = Gesamtradioaktivität
g_o = 0,25 µMol 1-Naphthol im Ansatz zur Zeit t = 0
t = Inkubationszeit (min)
P = Proteingehalt pro ml der verwendeten Mikrosomensuspension
f_1 = Verdünnungsfaktor (f_1 = 25)

2.8. Bestimmung von Cytochrom P-450

Für die Bestimmung von Cytochrom P-450 in Rattendarmmikrosomen unter aeroben Bedingungen wurde die Methode von OMURA und SATO 1964 herangezogen. Dabei wird das Differenzspektrum zwischen reduziertem und reduziertem CO begastem Hämoprotein im Spektrophotometer gemessen.

Bestimmungsansatz:

1 ml 20% Rattendarmmikrosomenlösung in ein Eppendorfhütchen pipettieren. Zur Reduktion ungefähr 5 mg kristallines $Na_2S_2O_4$ zufügen und bei ca. 4° C 3 min mischen. Jeweils 0,5 ml in 2 Küvetten mit schwarzen Seitenwänden (Schichtdicke 1 cm) geben und die Nullinie schreiben. Danach den Inhalt einer der Küvetten 60 s kleinblasig mit CO begasen und anschließend das Differenzspektrum aufzeichnen.

Bei Lebermikrosomen wurde eine 10% Lösung verwendet.

Berechnung:

Gemessen wird die Extinktionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm und mit der Nullinie korrigiert.

$$\frac{\Delta A \times 1000}{m \times P} = \text{nMol/mg Protein}$$

ΔA = Korrigierte Extinktionsdifferenz
m = millimolarer Extinktionskoeffizient (91 mM^{-1} cm^{-1})
P = Proteingehalt pro ml der verwendeten Mikrosomensuspension.

2.9. Bestimmung von Cytochrom b_5

Hier wird das Differenzspektrum zwischen luftgesättigten und mit $Na_2S_2O_4$ reduzierten Darmmikrosomen gemessen. Die Methode wurde ebenfalls von OMURA und SATO übernommen.

Bestimmungsansatz:

In 2 Küvetten mit schwarzen Seitenwänden (Schichtdicke 1 cm) werden jeweils 0,5 ml 20% Darmmikrosomenlösung pipettiert und die Nullinie geschrieben. Danach wird der Inhalt einer Küvette mit einigen Milligramm Natriumdithionit reduziert und das Differenzspektrum aufgezeichnet. Bei Lebermikrosomen wurde 10% Lösung verwendet.

Berechnung:

Gemessen wird die Extinktionsdifferenz zwischen 390 und 426 nm und mit der Nullinie korrigiert.

$$\frac{\Delta A \times 1000}{m \times P} = \text{nMol/mg Protein}$$

ΔA = korrigierte Extinktionsdifferenz
m = millimolarer Extinktionskoeffizient (185 mM^{-1} cm^{-1})
P = Proteingehalt pro ml der verwendeten Mikrosomensuspension.

2.10. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von LOWRY et al. 1951. Die Reaktion gliedert sich in 2 Stufen: 1. Bildung eines Kupfer - Chelat - Komplexes mit den vorhandenen Peptidbindungen und 2. Reduktion der Phosphormolybdän - Phosphorwolframsäure durch aromatische Aminosäuren - Kupfer - Chelat - Komplexe. Die dabei entstehende Blaufärbung ist am Eppendorf Photometer bei 772 nm meßbar. Da bei der Lowry-Proteinbestimmung Variationen der Farblösungen auftreten können, muß bei jeder Bestimmung eine neue Eichkurve mit Rinderserumalbumin erstellt werden.

Lösungen:

1. 2% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

2. 2% K - Na - Tartrat in aqua dest.

3. 1% $CuSO_4$ x 5 H_2O in aqua dest.

4. Folin - Ciocalteus - Phenol - Reagenz

5. 1% Rinderserumalbumin

Mischung A: Lösungen 1,2 und 3 wie 100 : 1 : 1 mischen; bei jeder Bestimmung frisch ansetzen, dabei zuerst 2 und 3 mischen und dann 1 zugeben.

Mischung B: 4 mit aqua dest. 1 : 1 verdünnen.

a. Bestimmung in Darmmikrosomen

	Leerwert (ml)	Standard (ml)	Probe (ml)
Probe	--	--	0,01 0,03
Rinderalbumin 1%	--	0,002	--
		0,004	
		0,005	
aqua bidest	1,0	1,0	0,99 0,97
Mischung A	5,0	5,0	5,0 5,0
gut mischen, 10 - 12 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dann Zugabe von			
Mischung B	0,5	0,5	0,5 0,5
mischen, bei Raumtemperatur mindestens 30 min stehen lassen. Extinktion der Proben und der Standardwerte gegen die Extinktion des Leerwerts bei 772 nm messen.			

b. Bestimmung in Lebermikrosomen

Da der 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 eine geringe Eigenextinktion hat, wird 2 weiteren Ansätzen die den Proben entsprechende Menge des Puffers zugefügt (0,01, 0,03 ml) und die Extinktion der Proben gegen die entsprechenden Trisleerwerte gemessen.

Auswertung:

Aus den Extinktionen der Standardwerte und den dazu gehörenden Proteinmengen läßt sich eine Eichkurve zeichnen, an der der Proteingehalt der einzelnen Ansätze abgelesen werden kann.

Bei 0,01 ml Ansatz x 100 ergibt mg Protein/ml
bei 0,03 ml Ansatz x33,3 ergibt mg/Protein/ml.

Der Mittelwert wird aus den Doppelbestimmungen beider Konzentrationen errechnet.

2.11. Statistische Auswertung

Die rechnerische Auswertung erfolgte mit einem Taschenrechner "Privileg SR 80D-NC" (Quelle).
Kurvengleichungen, Regressionskoeffizient und t-Test zum Vergleich unabhängiger Stichproben wurden an einem programmierbaren Rechner "Hewlett Packard 97 Calculator" ermittelt.

Als Signifikanztest wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die p-Werte wurden den Non-Parametric Statistical Methods von HOLLANDER und WOLFE 1973 entnommen.

3. ERGEBNISSE

Zunächst mußte der optimale Reaktionsbereich zur Bestimmung der Enzyme EOD, Reduktase und Naphthol-Glucuronyltransferase sowie für die Cytochrome P-450 und b_5 in Rattendünndarmmikrosomen ermittelt werden. Für Rattenlebermikrosomen war dieser Bereich bereits bekannt.

3.1. 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase

3.1.1. Abhängigkeit der spez. EOD-Aktivität von der Proteinkonzentration der mikrosomalen Suspension

In Abb. 1 ist die Abhängigkeit des während der Inkubation gebildeten Produkts Umbelliferon von der im Testansatz enthaltenen Proteinmenge aufgezeigt. Bei einer Inkubationszeit von 20 min und 37° C verläuft die Umsetzung bis zu einer Proteinmenge von mindestens 0,6 mg linear. Dieser Proteinwert entspricht in etwa einer 20% Darmmikrosomensuspension (d.h. 200 mg Feuchtgewicht/ml Puffer). Die untere Nachweisbarkeitsgrenze liegt also bei circa 25 mg Feuchtgewicht pro ml Puffer.

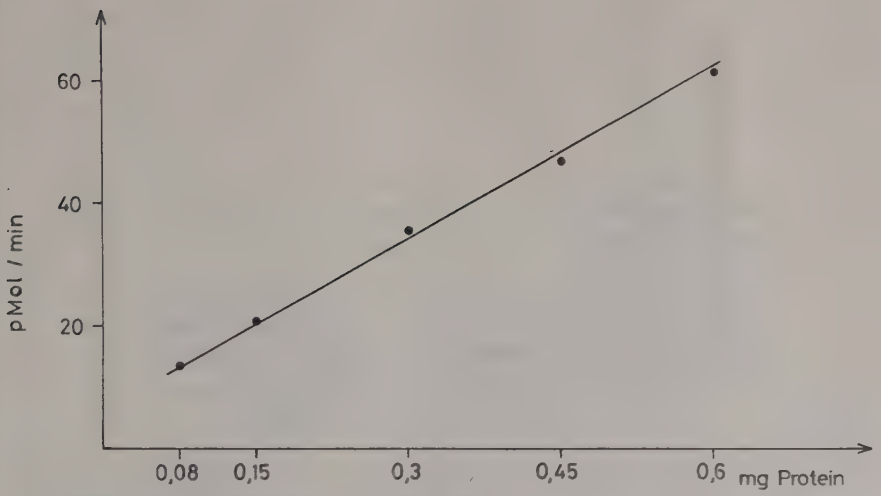


Abb.1: EOD-Aktivität in Abhängigkeit vom Proteingehalt der mikrosomalen Suspension (Mittelwert aus Doppelbestimmungen).

3.1.2. Abhängigkeit der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylierung von der Inkubationszeit

Da sich die Enzymaktivität durch Substratmangel, Produkthemmung und/oder Enzyminaktivierung mit zunehmender Inkubationszeit verringert, ist es wichtig, den Arbeitsbereich so zu wählen, daß eine lineare Proportionalität zwischen Ausbeute und Inkubationszeit besteht. Abbildung 2 zeigt, daß dies bis zu einer Inkubationszeit von 25 min gewährleistet ist. Danach nimmt die Enzymaktivität ab, sodaß insgesamt das typische Bild einer Sättigungskurve entsteht. Die in den Methoden gewählte Inkubationszeit von 20 min liegt folglich im linearen Kurvenbereich.

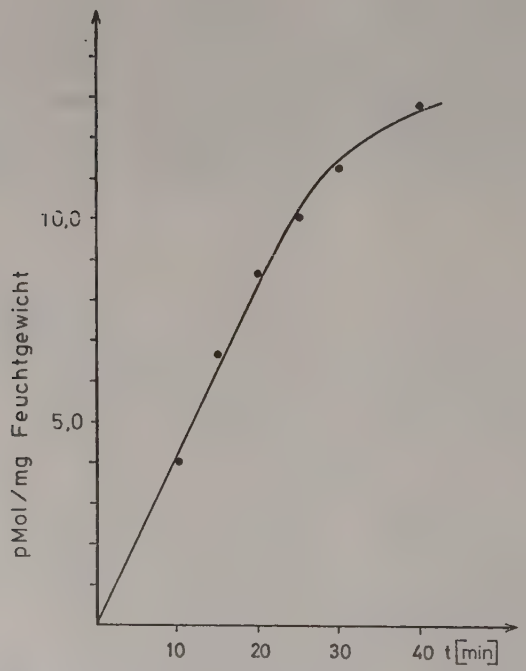


Abb.2: EOD-Aktivität der 10% mikrosomalen Suspension in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

3.2. NADPH - Cytochrom C - Reduktase

3.2.1. Proteinabhängigkeit

Die NADPH-Cytochrom C-Reduktase liegt als sogenanntes "Marker-Enzym" der mikrosomalen Fraktion hier in besonders hoher Aktivität vor. Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, besteht nur bis zu einer Proteinmenge von 0,045 mg Protein eine lineare Abhängigkeit.
Dieser Proteinwert entspricht in etwa einer 5% Darmmikrosomensuspension.

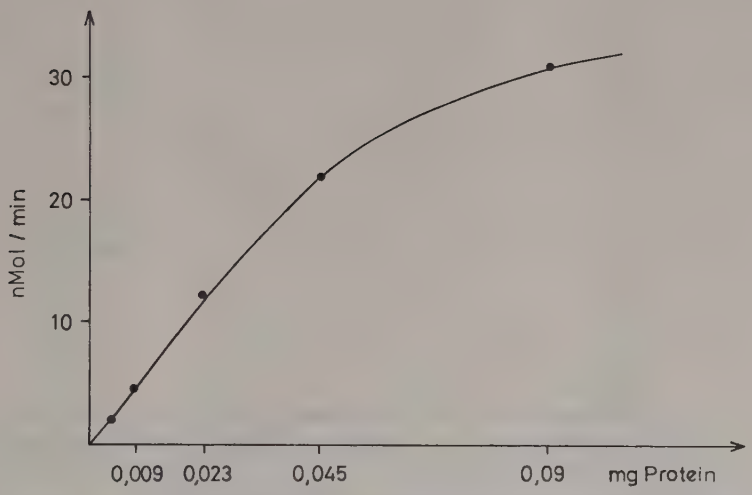


Abb. 3: Abhängigkeit der NADPH-Cytochrom C-Reduktase in Rattendünndarmmikrosomen von der Proteinmenge der mikrosomalen Suspension.

3.3. 1-Naphthol-Glucuronyltransferase

3.3.1. Proteinabhängigkeit der 1-Naphthol-Glucuronidierung

Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der während der Inkubation gebildeten 1-Naphtholglucuronidmenge von der Proteinkonzentration und damit auch von der im Test eingesetzten Enzymmenge. Bei einer Inkubationszeit von 10 min und 37° C war die Glucuronidierungsrate der aktivierten Form bis zu einer Proteinmenge von mindestens 0,36 mg Protein konstant.

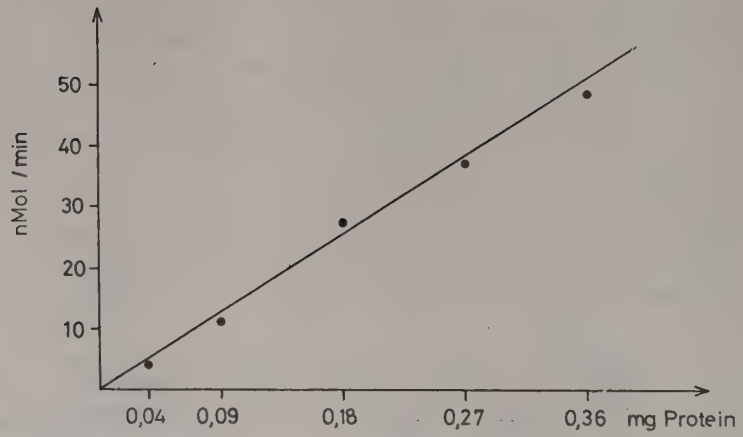


Abb. 4: 1-Naphtholglucuronidierung in Abhängigkeit von der mikrosomalen Proteinmenge (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

3.3.2. Zeitabhängigkeit der 1-Naphtholglucuronidierung

Die Glucuronidierungsrate der aktivierten Glucuronyltransferase sind, wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, mindestens bis zu einer Inkubationszeit von 20 min bei 37° C konstant. Eine Begrenzung der Inkubationszeit auf 10 min garantiert daher die Messung initialer Glucuronidierungsraten.

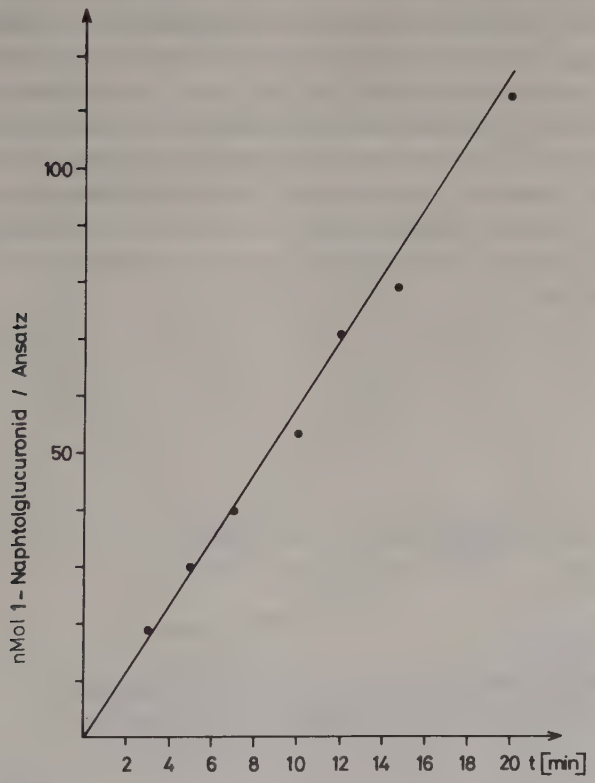


Abb. 5: 1-Naphtholglucuronidierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen in 15% mikrosomaler Suspension).

3.3.3. Einfluß verschiedener Brij-Konzentrationen auf die spez. Aktivität der Glucuronyltransferase

Die Glucuronyltransferase wird als membrangebundenes Enzym des endoplasmatischen Retikulums in ihrer Aktivität vom Zustand der Membranstruktur erheblich beeinflußt. Mittels Detergentien läßt sich die Aktivierung am leichtesten erreichen. Bei steigender Detergenzkonzentration nimmt die spez. Aktivität anfänglich rasch zu (Abb. 6) und fällt nach Erreichen eines flachen Aktivitätsmaximums nur langsam wieder ab. Durch Zugabe des Detergenz Brij 58 ließ sich die spez. Aktivität der nativen Glucuronyltransferase um das 2 - 3-fache steigern. Die höchsten Aktivitäten wurden bei einer Brij-Konzentration von 0,02 - 0,05% im Inkubationsansatz gemessen. Zur Bestimmung der aktivierten Glucuronyltransferase wurde in den Versuchen eine 0,5% Brij-Lösung verwendet. Dies entspricht einer Brij-Konzentration von 0,05% im Testansatz. Diese Konzentration erlaubt die Messung hoher und relativ stabiler Aktivitätswerte in Bezug auf Änderungen der Brij-Konzentration.

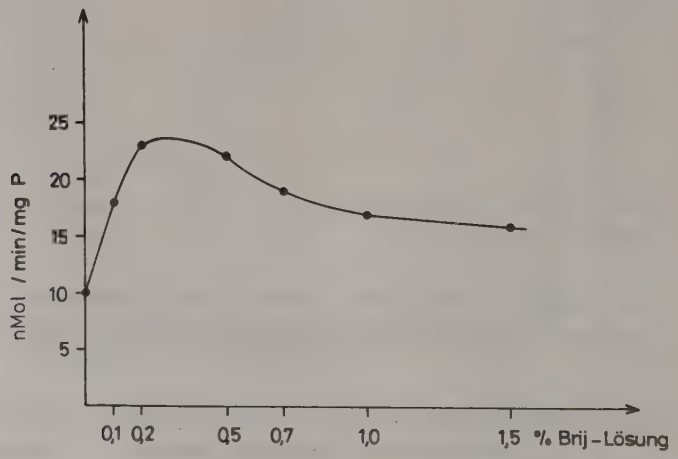


Abb. 6: Einfluß verschiedener Brij-Konzentrationen auf die spez. Aktivität der Glucuronyltransferase der 20% mikrosomalen Suspension (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

3.4. Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5

3.4.1. Proteinabhängigkeit von Cytochrom P-450

In Abb. 7 ist der Gehalt an Cytochrom P-450 in Relation zur Proteinkonzentration der Darmmikrosomensuspension aufgezeichnet. Es ergab sich ein linearer Bereich von 0,4 bis mindestens 1,9 mg Protein/ml mikrosomaler Lösung. Unter 0,4 mg Protein/ml konnte kein zuverlässiges Differenzspektrum mehr nachgewiesen werden.

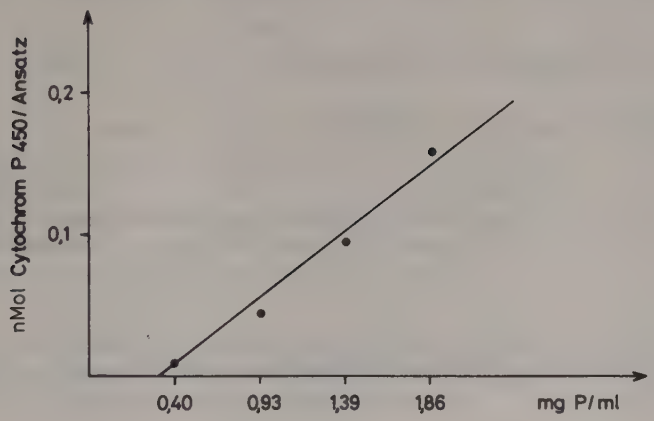


Abb. 7: Cytochrom P-450 Gehalt in Rattendünndarmmikrosmen in Abhängigkeit von der mikrosomalen Proteinkonzentration.

3.4.2. Proteinabhängigkeit von Cytochrom b_5

Für den Gehalt an Cytochrom b_5 in Rattendarmmikrosomen konnte bis mindestens 1,7 mg Protein/ml ein linearer Kurvenverlauf festgestellt werden.

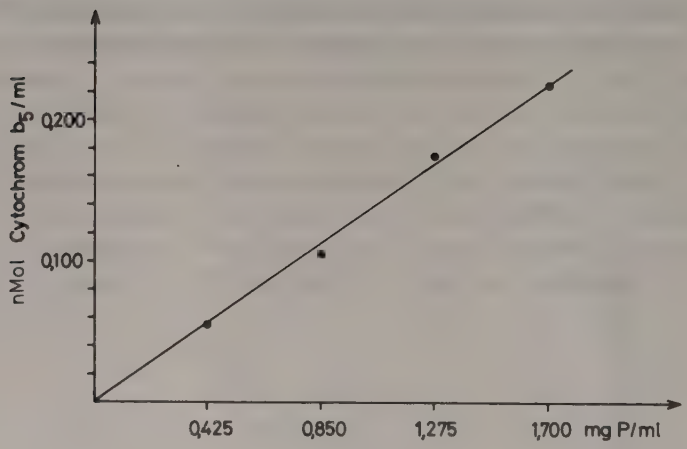


Abb. 8: Cytochrom b_5 Gehalt in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der mikrosomalen Proteinkonzentration.

3.5. Versuch der Bestimmung von PNA in Rattendünndarmmikrosomen

Versuche zur Bestimmung der PNA in Rattendünndarmmikrosomen nach der von NETTER 1964 für Lebermikrosomen erarbeiteten Methode waren trotz mehrfacher Abänderungen der Versuchsbedingungen erfolglos.

3.6. Wiedergewinnungsraten in Rattendünndarmmikrosomen

Wiedergewinnungsraten zeigen die Abnahme der Gesamtenzymaktivität während den jeweiligen Präparationsschritten. Die prozentuale Gesamtaktivität im 9 000 g Überstand und in den Mikrosomen bezogen auf das Homogenat gibt Anhaltspunkte dafür, in welchen Fraktionen diese Enzyme bevorzugt vorkommen und über die Verluste bei der Präparation.

Die Wiedergewinnungsraten der Enzyme EOD, Reduktase und N-GT sowie der Proteingehalt sind im einzelnen aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Wiedergewinnungsraten von EOD, Reduktase, N-GT und des Proteins im 9 000 g Überstand und den Mikrosomen

	Gesamtaktivität			
	EOD	Reduktase	N-GT	Proteingehalt
Homogenat	100 %	100 %	100 %	100 %
9 000 g SNT	71 %	39 %	43 %	60 %
Mikrosomen	25 %	33 %	29 %	12 %

Tab. 2: Spez. Aktivität von EOD, Reduktase und N-GT im Homogenat, 9 000 g Überstand und den Mikrosomen

	Spezifische Aktivität		
	EOD (pMol/min/mg P)	Reduktase (nMol/min/mg P)	N-GT (nMol/min/mg P)
Homogenat	14,7	15,2	7,6
9 000 g SNT	17,1	19,1	10,6
Mikrosomen	34,1	42,8	25,9

3.7. Reaktion der Enzymaktivitäten im Rattendünndarm auf unterschiedliche Diätformen

An die Versuchstiere wurden 3 verschiedene Diäten verfüttert: Die Rattenstandarddiät 1310 (Rohdiät), die semisynthetische Diät C 1000 mit eingepreßtem 1,2 Dimethylhydrazin und die gleiche semisynthetische Diät ohne Karzinogen als Kontrolldiät. Da in den Vorversuchen die Rohdiät gefüttert wurde und an die Kontrolltiere der Karzinogenversuche die semisynthetische Diät, konnte aus den jeweiligen Ergebnissen der Einfluß der Diätform auf die Meßwerte im Rattendünndarm bestimmt werden.

Die spezifische Aktivität der Enzyme EOD, Reduktase und Naphthol-Glucuronyltransferase blieb von der Diätform weitgehend unbeeinflußt. Der Gehalt an Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 war jedoch bei der semisynthetischen Diät signifikant niedriger.

Tab. 3: Einfluß der Diätform auf die Meßparameter in Rattendünndarmmikrosomen

	Semisyn.Diät C 1000	n	Standarddiät 1310	n	p
EOD pMol/min/mg P	25.8 ± 10.4	17	27.6 ± 10.0	24	---
N-GT nMol/min/mg P	19.1 ± 4.4	15	21.9 ± 4.9	15	---
Reduktase nMol/min/mg P	63.8 ± 17.4	15	50.2 ± 11.2	13	---
Cytochrom b_5 nMol/mg P	0.101±0.024	14	0.127±0.011	9	< 0.005
Cytochrom P-450 nMol/mg P	0.030±0.005	11	0.056±0.017	12	< 0.005

3.8. Einflüsse des Karzinogens DMH

3.8.1. - auf die Futteraufnahme der Versuchstiere (Abb.9)

Während der Versuchszeit wurden je 4 Ratten in einem Käfig gehalten und für diese täglich die Futteraufnahme insgesamt bestimmt. Die Wiegegenauigkeit betrug ± 2,5 g. Nach einer Eingewöhnungszeit von 7 Tagen wurde die Futteraufnahme erstmals gemessen.

An den ersten zwei Versuchstagen war noch kein signifikanter Unterschied in der aufgenommenen Futtermenge zwischen Versuchs- und Kontrolltieren feststellbar. Vom dritten Tag an fraßen die mit DMH behandelten Tiere signifikant weniger, obwohl auch bei den Kontrolltieren über den gesamten Versuchszeitraum eine geringfügige Abnahme der Nahrungsaufnahme zu beobachten war.

Tab. 4: Einfluß von DMH auf die Futteraufnahme

Fütterungsdauer (Tage)	Kontrolltiere (g/4 Ratten)	n	Versuchstiere (g/4 Ratten)	n	p
1	87 ± 10	12	82 ± 11	21	-------
2	86 ± 9	13	78 ± 12	19	-------
3	84 ± 11	13	74 ± 13	16	< 0.05
4	85 ± 7	10	75 ± 9	13	< 0.05
5	80 ± 7	10	67 ± 10	10	< 0.005
6	81 ± 9	8	70 ± 10	7	< 0.05
7	78 ± 8	8	67 ± 11	8	< 0.01
14	77 ± 8	11	59 ± 6	21	< 0.0005
28	76 ± 8	7	57 ± 6	21	< 0.0005
91	70 ± 7	14	56 ± 12	14	< 0.0025

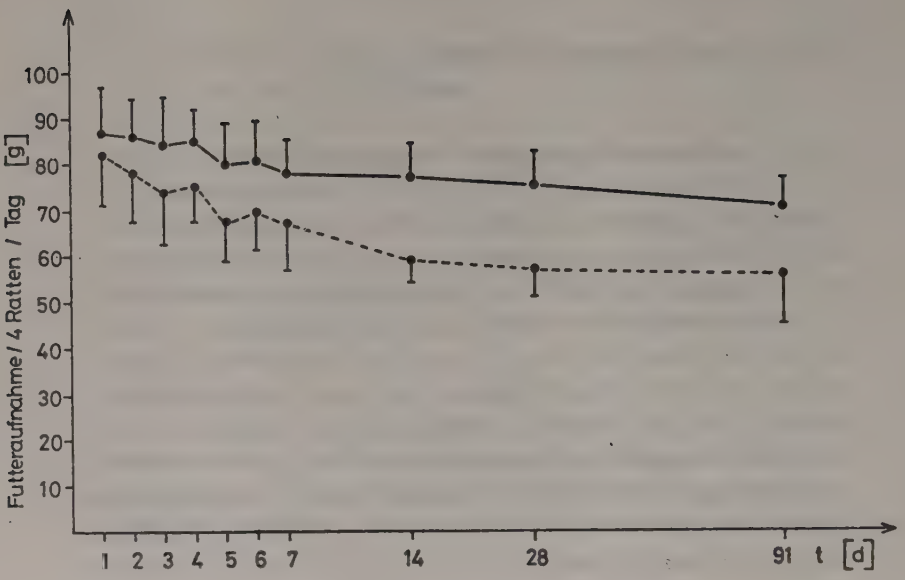


Abb. 9: Futteraufnahme mit und ohne DMH in der Diät
(--------- Versuchstiere, ———— Kontrolltiere)

3.8.2. - auf die Entwicklung des Körpergewichts von Versuchs- und Kontrolltieren (Abb. 10)

Zu Versuchsbeginn betrug das Gewicht der Kontrolltiere 230,8 ± 15,2 g (n=40), das Gewicht der Versuchstiere 237 ± 9,4 g (n=72). Das Körpergewicht der Tiere beider Versuchsgruppen nahm über die gesamte Versuchszeit kontinuierlich zu. Die Versuchstiere nahmen aber ab dem 7.Tag der DMH Fütterung signifikant weniger zu. Am Versuchsende (91. Tag) wogen die Kontrolltiere 437,5 ± 22,1 g die Versuchstiere 352,5 ± 25,0 g. Die Gewichtszunahme der mit DMH gefütterten Tiere lag damit um 44% unter der der Kontrolltiere. Ein Unterschied in der Spontanaktivität der Tiere war zwischen beiden Gruppen nicht feststellbar.

Tab. 5: Gewichtsentwicklung von Kontroll- und Versuchstieren bei DMH Fütterung.

Fütterungs-dauer (Tage)	Kontrolltiere (Gewicht in g)	n	Versuchstiere (Gewicht in g)	n	p
1	---	--	255.0 ± 10.0	12	----
2	---	--	262.5 ± 7.5	12	----
3	265.8 ± 13.1	12	260.0 ± 8.3	12	n.s.
4	---	--	267.1 ± 11.2	12	----
5	280.6 ± 9.4	8	275.5 ± 9.8	12	n.s.
7	289.7 ± 19.0	24	271.7 ± 25.0	24	<0.05
14	290.0 ± 7.5	8	251.8 ± 13.0	16	<0.0005
28	347.5 ± 5.0	4	278.3 ± 11.9	12	<0.0005
91	437.5 ± 22.1	4	352.5 ± 25.0	4	<0.0025

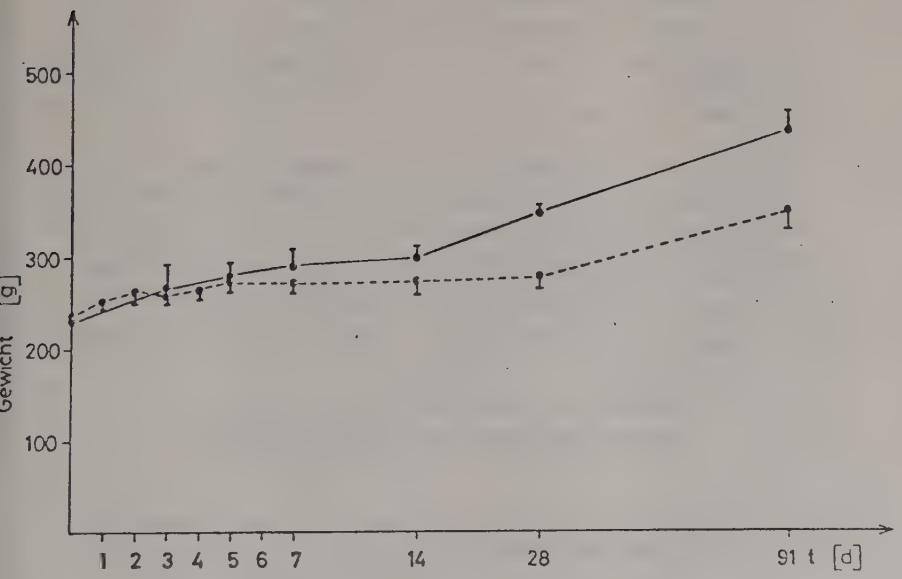


Abb. 10: Gewichtsentwicklung von Versuchs- und Kontrolltieren (------Versuchstiere, _____ Kontrolltiere)

3.8.3. - auf den mikrosomalen Proteingehalt in Leber- und Darmgewebe

Das Karzinogen verändert weder im Darm- noch im Lebergewebe den Proteingehalt der Mikrosomenfraktion. Dies gilt sowohl für die einzelnen Tageswerte, wie für den Mittelwert über beide Versuchsreihen.

Proteingehalt der Darmmikrosomen

Kontrolltiere: 9.1 ± 1.6 mg Protein/g Darmgewebe (n = 37)
Versuchstiere: 8.9 ± 1.4 mg Protein/g Darmgewebe (n = 30)

Proteingehalt der Lebermikrosomen

Kontrolltiere: 14.7 ± 3.5 mg Protein/g Lebergewebe (n = 16)
Versuchstiere: 14.7 ± 2.5 mg Protein/g Lebergewebe (n = 33)

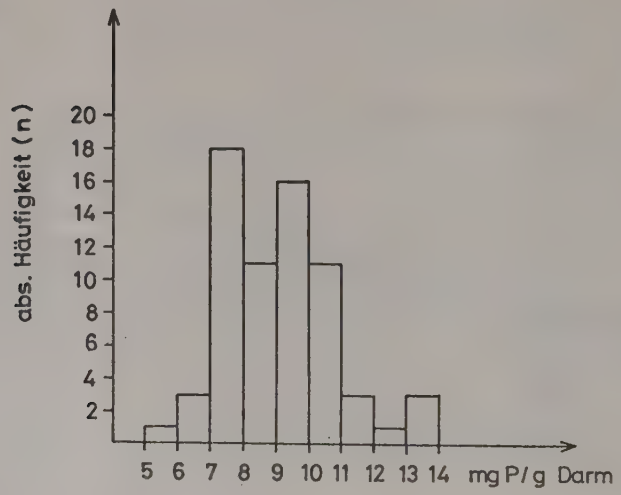


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Proteinwerte in der Mikrosomenfraktion des Darmgewebes.

3.9. Reaktion des Monooxygenase-Systems und der Naphthol-Glucuronyltransferase auf die Gabe von DMH im Zeitablauf

Die den Abb. 12 bis 17 zugrunde liegenden Werte, sowie deren Standardabweichungen und der jeweilige Stichprobenumfang sind den Tab. 6 und 7 auf Seite 44 und 45 zu entnehmen.

3.9.1. 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase

Die spezifische Aktivität, sowie die Gesamtaktivität der EOD wurde am 1. bis 5., 7., 14., 28. und 91. Tag der DMH Gabe bestimmt (Abb. 12). An jedem dieser Tage wurde zusätzlich eine Kontrollbestimmung durchgeführt, so daß sich der Normbereich aus 9 Werten errechnet. Während der ersten 3 Fütterungstage war keine wesentliche Aktivitätsveränderung festzustellen, am 4. und 5. Versuchstag folgen zunächst ein deutlicher Anstieg und am 7. Tag ein steiler Abfall der EOD-Aktivität. Im weiteren Zeitverlauf bis zum 91. Tag gleichen sich die Werte dem Normbereich wieder an. Der Verlauf der EOD-Gesamtaktivität ist mit dem der spezifischen Aktivität nahezu identisch.

Parallel dazu wurde spezifische und Gesamtaktivität der EOD in Lebermikrosomen gemessen. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität ist aus Abb. 12 zu entnehmen. Wie in den Dünndarmmikrosomen ist eine Aktivitätserhöhung und in der Folge eine Aktivitätsminderung zu erkennen. Allerdings bleiben die Werte vom 7. bis zum 91. Tag an der unteren Grenze des Normbereichs.

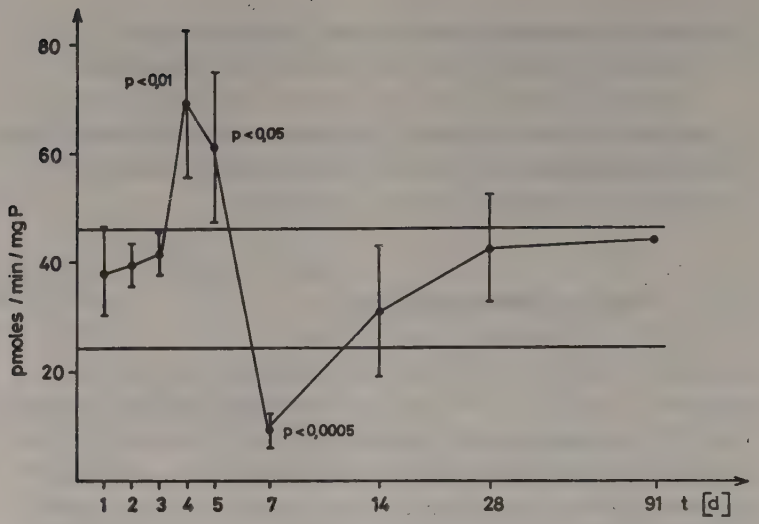


Abb. 12: Spez. EOD-Aktivität in Rattendarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 6).

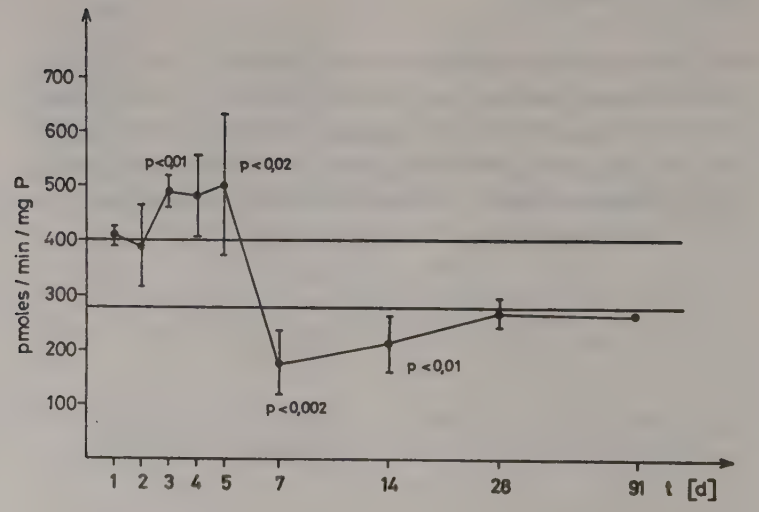


Abb. 13: Spez. EOD-Aktivität in Rattenlebermikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 7).

3.9.2. Reduktase und Cytochrom b_5

Weder im Dünndarm noch in der Leber konnte bei DMH Fütterung eine Veränderung der Reduktaseaktivität festgestellt werden. Dies gilt sowohl für die Gesamt- wie für die spezifische Aktivität, die für Darmmikrosomen in Abb. 14 dargestellt ist. Ebenso konnte in den beiden untersuchten Organen keine signifikante Veränderung des Cytochrom b_5 Gehaltes über die Dauer der DMH Gabe gemessen werden. Diese relative Konstanz des Cytochrom b_5 Gehaltes zeigt sich sowohl bezogen auf die Proteinmenge der mikrosomalen Lösung als auch bezogen auf das Feuchtgewicht der Proben.

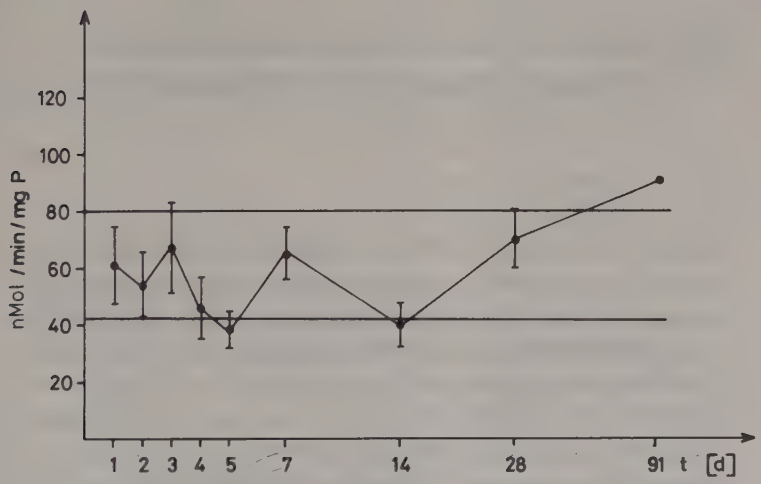


Abb. 14: Spezifische Reduktaseaktivität in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 6).

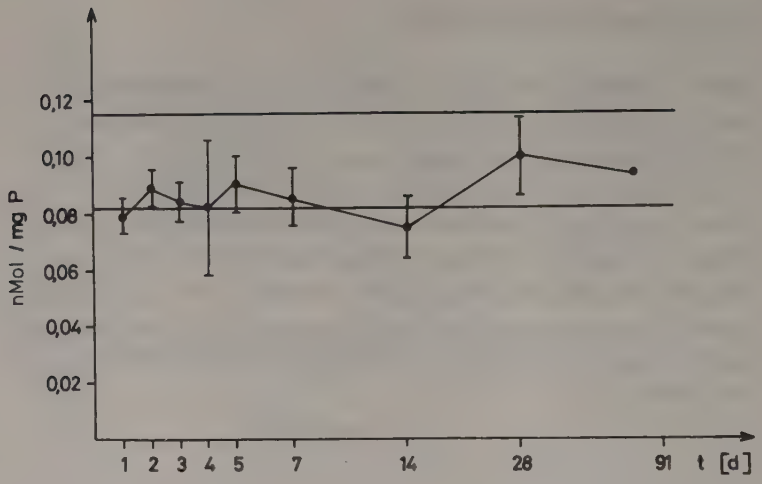


Abb. 15: Cytochrom b_5 Gehalt in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 6).

3.9.3. Cytochrom P-450 (Abb. 16)

Der Gehalt an Cytochrom P-450 in Rattendünndarmmikrosomen bleibt bis zum 4. Tag der DMH Fütterung weitgehend konstant, erreicht dann aber bis zum 7. Tag einen Minimalwert. Diese Entwicklung entspricht der bei EOD und der Naphthol-Glucuronyltransferase. Vom 7. Fütterungstag an nimmt der Cytochrom P-450 Gehalt dann kontinuierlich zu und liegt vom 28. Tag an signifikant über den Kontrollwerten. Im Gegensatz dazu bleiben die Werte in den Lebermikrosomen über die gesamte Fütterungsdauer im Normalbereich, lediglich der Wert am 91. Tag ist leicht erhöht. Eine Zufallsabweichung kann hier nicht ausgeschlossen werden, da nur ein Meßwert vorliegt.

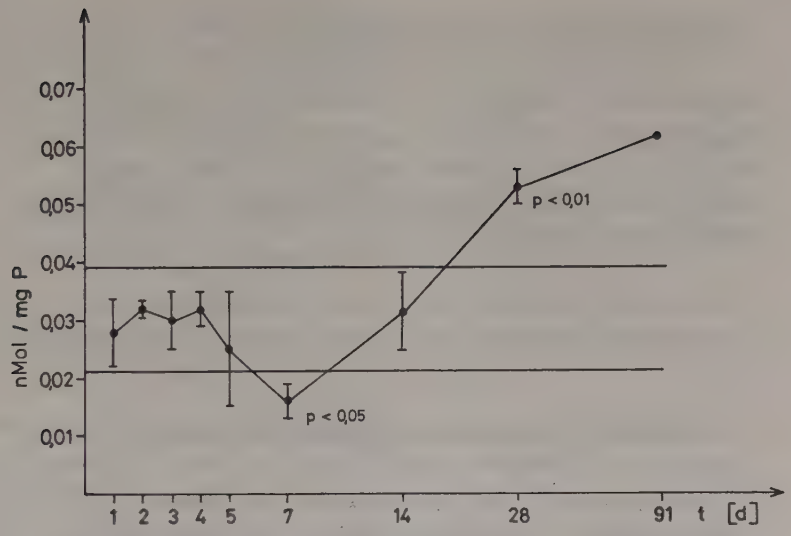


Abb. 16: Gehalt der Rattendünndarmmikrosomen an Cytochrom P-450 in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 6).

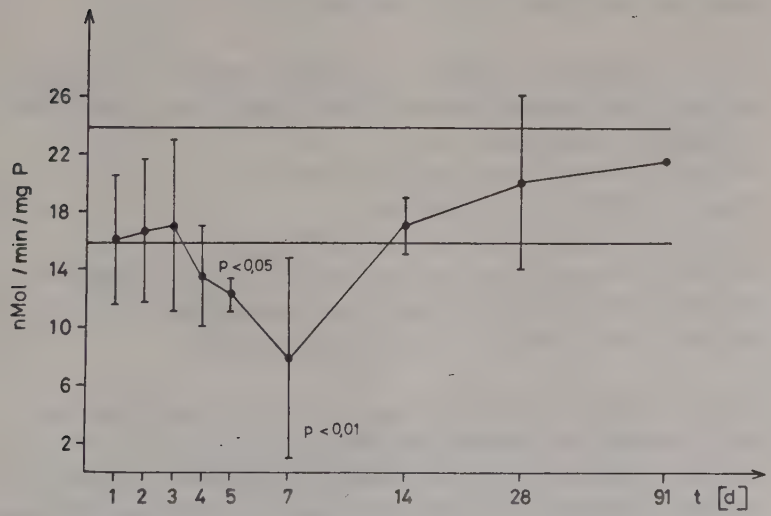


Abb. 17: Spez. Aktivität der Naphthol-Glucuronyltransferase in Rattendünndarmmikrosomen in Abhängigkeit von der Dauer der DMH Gabe (vgl. Tab. 6).

3.9.4. Naphthol-Glucuronyltransferase (Abb. 17)

Nach anfänglicher Konstanz fällt die Aktivität (spezifische und Gesamtaktivität) der Naphthol-Glucuronyltransferase im Dünndarm vom 5. bis zum 7. Tag der DMH Fütterung signifikant unter die Kontrollwerte. An den folgenden Bestimmungstagen liegen die Werte wieder im Kontrollbereich.

Im Lebergewebe blieb die spezifische und die Gesamtaktivität der Glucuronyltransferase über den gesamten Zeitraum im Normbereich.

3.10. Reversibilität und Spezifität der Karzinogenwirkung

Bei den Enzymen EOD und Glucuronyltransferase, sowie bei Cytochrom P-450 wurde nach 7 Tagen DMH Diät jeweils eine Erniedrigung der Enzymaktivität im Dünndarm beobachtet. Die spezifische Aktivität der EOD fiel von 35.8 $\pm$ 11.4 (n=9) auf 9.6 $\pm$ 3.3 (n=6) pMol/min/mg P, die Naphthol-Glucuronyltransferase von 19.3 $\pm$ 4.0 (n=9) auf 7.9 $\pm$ 7.2 (n=6) nMol/min/mg P, der Cytochrom P-450 Gehalt von 0.036 $\pm$ 0.010 (n=8) auf 0.016 $\pm$ 0.003 (n=3) nMol/mg P.

Nach 7 weiteren Tagen an denen den Tieren die Kontrolldiät ohne DMH gefüttert wurde, wurden dieselben Bestimmungen wieder durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:
EOD 31.2 $\pm$ 1.4 (n=3), Glucuronyltransferase 13.8 $\pm$ 3.0 (n=3), Cytochrom P-450 0.054 $\pm$ 0.010 (n=3).

Bei EOD und Naphthol-Glucuronyltransferase ist also eine Entwicklung in Richtung Normalbereich zu beobachten, während Cytochrom P-450 den Bereich der Normalwerte signifikant überschreitet.

Da DMH als selektives Darmkarzinogen wirkt, sollte geprüft werden, ob die verursachten Veränderungen DMH-spezifisch sind, oder ob ein Leberkarzinogen (wie Diäthylnitrosamin) vergleichbare Veränderungen wie DMH im Rattendünndarm verursachen kann. Nach 7-tägiger DENA Gabe

im Trinkwasser zeigte sich lediglich bei der Naphthol-Glucuronyl-transferase ein Abfall der Enzymaktivität im Dünndarm ähnlich dem bei DMH Gabe (7 Tage DMH 7.9 $\pm$ 7.2 nMol/min/mg P, 7 Tage DENA 8.4 $\pm$ 3.1 nMol/min/mg P).

Die EOD Aktivität wich unter DENA Gabe sowohl im Dünndarm (33.7 $\pm$ 4.7 pMol/min/mg P, n=3), wie in der Leber (419.3 $\pm$ 122.7 pMol/min/mg P, n=3) nicht signifikant von den Kontrollwerten ab.

3.11. Histologie

An den jeweiligen Bestimmungstagen wurden Proben des Darm- und Lebergewebes entnommen und zur histologischen Begutachtung gegeben. Besonderer Wert wurde bei der Beurteilung auf eventuell vorhandene Malignitätszeichen gelegt. Alle Proben wurden als unauffällig strukturiertes Gewebe bezeichnet. Lediglich bei den Tieren, die 91 Tage mit DMH gefüttert wurden entsprach der Darmbefund einer geringgradigen subakuten Jejunitis.

	7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase		Glucuronyltransferase		NADPH Cytochrom C Reduktase		Cytochrom P 450		Cytochrom b_5	
	pmol/min/mgP	pmol/min/10mg w.w.	nmol/min/mgP	nmol/min/10mg w.w.	nmol/min/mgP	nmol/min/10mg w.w.	nmol/mgP	nmol/10 mg w.w.	nmol/mgP	nmol/10 mg w.w.
Kontrollwert (n=9)	35.8 ± 11.4	4.0 ± 1.2	19.3 ± 4.0	1.7 ± 0.4	61.4 ± 19.5	5.4 ± 1.6	0.030 ± 0.010	0.003 ± 0.001	0.099 ± 0.018	0.007 ± 0.002
1 Tag DMH (n=3)	38.5 ± 8.9	3.4 ± 1.1	15.0 ± 4.5	1.3 ± 0.5	60.6 ± 14.5	5.2 ± 1.5	0.028 ± 0.006	0.003 ± 0.001	0.079 ± 0.006	0.007 ± 0.002
2 Tage DMH (n=3)	39.7 ± 4.3	3.7 ± 0.6	16.3 ± 5.8	1.5 ± 0.4	54.2 ± 11.9	5.1 ± 1.3	0.032 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.089 ± 0.006	0.008 ± 0.001
3 Tage DMH (n=3)	41.6 ± 4.5	3.5 ± 0.5	16.5 ± 6.2	1.4 ± 0.6	67.2 ± 16.0	5.8 ± 1.9	0.030 ± 0.005	0.003 ± 0.001	0.084 ± 0.007	0.007 ± 0.001
4 Tage DMH (n=3)	69.1 ± 14.9	6.5 ± 1.7	13.5 ± 3.8	1.2 ± 0.3	46.2 ± 11.6	4.6 ± 0.2	0.032 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.082 ± 0.025	0.007 ± 0.001
5 Tage DMH (n=3)	61.9 ± 14.9	5.7 ± 2.2	12.3 ± 1.3	1.2 ± 0.2	38.4 ± 6.7	3.6 ± 0.5	0.025 ± 0.010	0.002 ± 0.001	0.090 ± 0.011	0.009 ± 0.001
7 Tage DMH (n=6)	9.6 ± 3.3	0.8 ± 0.2	7.9 ± 7.2	0.7 ± 0.6	65.7 ± 9.0	5.8 ± 0.7	0.016 ± 0.003	0.002 ± 0.002	0.085 ± 0.011	0.007 ± 0.001
14 Tage DMH (n=3)	31.8 ± 12.6	4.1 ± 1.7	16.9 ± 1.8	2.0 ± 0.4	40.0 ± 8.3	6.2 ± 0.6	0.032 ± 0.008	0.005 ± 0.001	0.075 ± 0.011	0.009 ± 0.002
28 Tage DMH (n=3)	43.3 ± 11.0	3.9 ± 0.8	20.2 ± 6.0	1.9 ± 0.3	70.8 ± 9.8	6.5 ± 0.5	0.054 ± 0.004	0.004 ± 0.001	0.100 ± 0.014	0.008 ± 0.001
91 Tage DMH (n=1)	44.9	3.6	21.6	1.6	91	7.1	0.062	0.005	0.094	0.007

Tab. 6: Spezifische Aktivität und Gesamtaktivität von EOD, Glucuronyltransferase, Reduktase, Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 in Rattendünndarmmikrosomen bei Verfütterung der semisynthetischen Diät C 1000 ohne DMH (Kontrollwert) und mit DMH nach unterschiedlich langer Fütterungsdauer.

	7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase		Glucuronyltransferase		NADPH Cytochrom C Reduktase		Cytochrom P 450		Cytochrom b_5	
	pmol/min/mgP	pmol/min/10mg w.w.	nmol/min/mgP	nmol/min/10mg w.w.	nmol/min/mgP	nmol/min/10mg w.w.	nmol/mgP	nmol/10 mg w.w.	nmol/mgP	nmol/10 mg w.w.
Kontrollwert (n=9)	342.5 ± 57.3	60.2 ± 19.4	43.7 ± 12.9	6.0 ± 1.6	173.6 ± 40.2	25.2 ± 4.3	0.543 ± 0.129	0.076 ± 0.015	0.533 ± 0.106	0.080 ± 0.016
1 Tag DMH (n=3)	411.8 ± 14.9	74.3 ± 8.4	38.7 ± 0.7	6.4 ± 1.1	177.3 ± 33.4	28.6 ± 3.6	0.572 ± 0.080	0.094 ± 0.023	0.509 ± 0.049	0.083 ± 0.013
2 Tage DMH (n=3)	388.7 ± 75.4	73.7 ± 19.1	43.3 ± 2.7	7.2 ± 1.5	181.9 ± 32.7	24.6 ± 6.0	0.566 ± 0.074	0.093 ± 0.019	0.472 ± 0.066	0.078 ± 0.014
3 Tage DMH (n=3)	488.0 ± 31.7	82.8 ± 12.9	41.7 ± 0.7	7.2 ± 1.5	140.8 ± 12.5	23.3 ± 5.8	0.512 ± 0.181	0.084 ± 0.019	0.522 ± 0.087	0.091 ± 0.018
4 Tage DMH (n=3)	474.3 ± 87.8	93.0 ± 45.2	48.3 ± 1.7	7.4 ± 0.5	159.9 ± 47.8	24.5 ± 7.3	0.551 ± 0.054	0.084 ± 0.007	0.484 ± 0.013	0.074 ± 0.004
5 Tage DMH (n=3)	502.9 ± 138	95.8 ± 29.5	48.7 ± 3.9	6.9 ± 1.4	139.3 ± 20.2	22.0 ± 5.8	0.546 ± 0.107	0.075 ± 0.007	0.552 ± 0.043	0.077 ± 0.012
7 Tage DMH (n=6)	177.9 ± 61.2	25.2 ± 8.2	42.7 ± 8.9	6.2 ± 1.4	171.8 ± 74.7	23.9 ± 9.0	0.400 ± 0.060	0.057 ± 0.007	0.415 ± 0.076	0.060 ± 0.008
14 Tage DMH (n=3)	251.8 ± 56.0	26.1 ± 12.0	39.5 ± 14.1	4.4 ± 0.9	195.5 ± 44.3	22.4 ± 4.1	0.494 ± 0.055	0.057 ± 0.006	0.612 ± 0.039	0.071 ± 0.013
28 Tage DMH (n=3)	275.9 ± 28.1	41.9 ± 8.6	55.4 ± 9.9	7.1 ± 0.9	194.3 ± 22.6	29.1 ± 1.7	0.540 ± 0.101	0.073 ± 0.015	0.596 ± 0.081	0.081 ± 0.013
91 Tage DMH (n=1)	265.5	37.4	44.9	6.5	220.9	31.1	0.676	0.123	0.625	0.088

Tab. 7: Spezifische Aktivität und Gesamtaktivität von EOD, Glucuronyltransferase, Reduktase, Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 in Rattenlebermikrosomen nach Verfütterung der semisynthetischen Diät C 1000 ohne DMH (Kontrollwert) und mit DMH nach unterschiedlich langer Fütterungsdauer.

4. DISKUSSION

4.1. Bewertung der Methoden

In neuerer Zeit beschäftigen sich viele Forschungsgruppen mit dem mischfunktionellen oder Monooxygenasesystem, dem eine immer größere Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus zugeschrieben wird. Es konnte zwischenzeitlich in Organismen aller Entwicklungsstufen und in einer Vielzahl von Organen wie Leber, Darm, Lunge, Niere, Haut und Placenta nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich Aktivitätsunterschiede in Bezug auf das Alter (RIFKIND 1974, TREDGER 1976), das Geschlecht (EL DEFRAWY 1973), die Organe (z.B. LAKE 1973) und die Organsegmente (HOENSCH 1976). Jedoch sind die bisher angegebenen Werte nur bedingt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Präparationsweisen, Bezugsgrößen, Einheiten der Meßwerte, Bestimmungszeitpunkte, Lagerungstemperaturen usw. gewählt wurden. Die Mehrzahl der Arbeiten beschäftigt sich mit dem mikrosomalen Monooxygenasesystem der Leber, in anderen Organen werden diese Enzyme erst seit kurzer Zeit zunehmend beschrieben. Ursachen hierfür sind sicherlich die wesentlich niedrigeren Aktivitäten in extrahepatischen Organen und die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten bei den Bestimmungen.

Die Reduktase, die geschwindigkeitsbestimmende (ULLRICH 1977), aber auch unspezifischste Komponente des Monooxygenasekomplexes, ist als mikrosomales "Marker-Enzym" wegen des hohen Enzymgehaltes einfach zu bestimmen. Die von den einzelnen Autoren (CHHABRA 1974, HOENSCH 1976, ABBOTH 1976, GÜNTHER 1977) angegebenen Werte für Darm- und Lebermikrosomen der Ratte differieren bei gleichen Bezugsgrößen folglich kaum und sind mit den in dieser Arbeit angegebenen vergleichbar.

Für die Bestimmung der EOD in Lebermikrosomen steht seit 1972 eine schnelle, einfache und zuverlässige, von ULLRICH und WEBER entwickelte Methode zur Verfügung. Ihre Anwendung bei Darmmikrosomen ist

jedoch problematisch, da die untere Erfassungsgrenze bei ungefähr 10 - 20 pMol 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) liegt (ULLRICH 1972). Die Aktivitätswerte in den Darmmikrosomen liegen nur knapp über diesem Bereich. Durch Einschalten eines dünnschichtchromatographischen Schrittes, der eine Trennung von 7-Äthoxycumarin und Umbelliferon ermöglicht (JAKOBSEN 1974, SCHMID unveröffentlichte Dissertation 1978) ist die Methode empfindlicher geworden. Nachteilig an dieser Methode ist die Vielzahl an Arbeitsschritten, darunter Eluation, Eindampfen, Ausschneiden der Chromatographieflecke, der Zeitaufwand und das Arbeiten mit flüchtigen organischen Lösungsmitteln. Dadurch ist diese Methode mit gewissen Fehlermöglichkeiten behaftet. Dennoch stimmen unsere EOD-Aktivitäten (4.0 ± 1.2 pMol/min/10 mg w.w.) gut mit den von PANTACK 1976 gemachten Angaben überein (0.66 ± 0.10 pMol/min/mg Rattendarm). Die Werte von KUENZIG 1977 liegen zwar höher (0.13 ± 0.05 nMol/min/mg P), sind aber nur begrenzt vergleichbar, da sie aus Versuchen mit Meerschweinchen stammen.

Die in den Lebermikrosomen bestimmten EOD-Aktivitäten liegen um den Faktor 10 höher als die der Darmmikrosomen und wurden mit 342.5 ± 57.3 pMol/min/mg P ermittelt. Bei ULLRICH findet man Werte zwischen 300 und 700 pMol/min/mg P.

Große Schwierigkeiten bereitete anfänglich die Bestimmung von Cytochrom P-450 in Darmmikrosomen. Es ist hier nur in geringer Menge vorhanden, im Gegensatz zum Kaninchen-, Hamster- oder Meerschweinchendarm (CHHABRA 1974). KNOLL 1977 und CHHABRA 1974 berichteten übereinstimmend mit anderen Arbeitsgruppen, daß es ihnen nicht gelungen ist, Cytochrom P-450 im Rattendünndarm nachzuweisen. Sie nahmen an, daß der Rattendünndarm irgendeine "Komponente" enthält, die die schnelle Umwandlung von P-450 in eines seiner Abbauprodukte katalysiert. KNOLL erwähnt jedoch auch, daß es HOENSCH und Mitarbeiter 1974 als einzigen gelang, diese Bestimmung ohne Schwierigkeiten durchzuführen.

Aus den anfangs bestehenden Problemen, die mit denen anderer Autoren weitgehend identisch waren, ergab sich, daß das Gelingen dieser an sich einfachen Bestimmung von einigen meist nicht beachteten Faktoren abhängig ist:

1. von der Menge des Reduktionsmittels; bei zuwenig Natriumdithionit ist die Reduktion unvollständig, die Ausbeute also zu gering; bei zuviel kommt es zu einer pH-Verschiebung und in deren Folge zur Proteinfällung mit Trübung der Lösung und Eigenabsorption. Als optimal ergaben sich 5 - 7 mg $Na_2S_2O_4$ pro ml 20% Mikrosomenlösung.

2. von dem in der Lösung noch vorhandenen Hämoglobin; um diesen Faktor auszuschalten ist es wichtig die Tiere vollständig zu entbluten und später die Mikrosomen zu waschen.

3. von der Menge und der Intensität der Darmspülung; hierdurch wird wahrscheinlich die von KNOLL 1977 erwähnte Darmkomponente (ev. Proteinasen) entfernt.

4. von der Zeit und der Temperatur der Lagerung, da P-450 relativ instabil ist.

Die so erhaltenen Werte stimmen gut mit denen von HOENSCH 1976 für die untere Villuszellschicht ermittelten überein. Die Messung von P-450 in Lebermikrosomen, in denen der Gehalt ungefähr 10 mal so hoch ist wie im Darm (TAKESUE 1968 bei Kaninchen, eigene Beobachtungen) bereitete keine Schwierigkeiten.

Ebenfalls problemlos war die Bestimmung von Cytochrom b_5 in Leber- und Darmmikrosomen. Die gefundenen Werte liegen jeweils in dem in der Literatur angegebenen Bereich. Auffallend war das Verhältnis Cytochrom P-450/b_5 in den Lebermikrosomen. Aus der Literatur ergibt es sich meist als 2 : 1, gefunden wurde aber ein Verhältnis von 1 : 1. Diese Diskrepanz laßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß hier das Lebergewebe mit Ultraschall behandelt wurde, was normalerweise

nicht üblich ist. Homogenisiert man mit einem Polytron-Homogenisator, der das Gewebe mehr aufschließt als ein Glas-Homogenisator, so finden AHMAD und BLACK 1977 im menschlichen Lebergewebe eine Relation von 1,2 : 1 und geben an, daß dies bei Ratten ähnlich ist.

Der Hydroxylierungsreaktion durch das Monooxygenase-System kann sich in einem zweiten enzymatischen Schritt noch eine Konjugation mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure anschließen. Über einen dieser Kopplungsschritte gibt die Aktivität der Glucuronyltransferase Aufschluß. Ein Vergleich der Werte ist hier kaum möglich, da verschiedene Substrate verwendet werden, einige Autoren die native Form bestimmen, andere die aktivierte Form bevorzugen. Diese verwenden wiederum unterschiedliche Aktivatoren z.B. Triton-X 100 (BOCK 1973, 1974), UDP-N-acetylglucosamin (JOSTING im Druck), Digitonin (UOTILLA 1976) oder Brij 58 (HUBER, Dissertation, Tübingen 1978). Dabei ergab sich, daß die Aktivierung mit Digitonin, UDP-N-acetylglucosamin oder Triton-X 100 eine wesentlich kleinere Ausbeute in Darmmikrosomen ergibt, als die hier verwendete Aktivierung mit Brij 58. In Lebermikrosomen sind die Werte von BOCK, bei denen mit Triton-X 100 gearbeitet wurde, gut mit den in dieser Arbeit erhaltenen vergleichbar.

Für alle Meßgrößen gilt, daß in der Leber im Vergleich zum Darmgewebe jeweils um den Faktor 2 - 10 höhere Werte gemessen werden. Dies ist verständlich, da die Leber zweifellos den Hauptteil der Fremdstoffe metabolisiert. In Bezug auf die Aktivität der einzelnen Zelle ist der Darm durchaus vergleichbar, obwohl die Gesamtaktivität der Mukosazellen im Vergleich zur Leber keine sehr hohe Aktivität aufweist (ULLRICH 1977).

4.2. Diätform und fremdstoffabbauende Enzyme

Es wurde die Reaktion des Monooxygenase-Systems und der Glucuronyltransferase des Rattendünndarms auf zwei verschiedene Diätformen geprüft. Dabei handelte es sich einmal um eine ungereinigte Rattenstandarddiät (Rohdiät) und zum anderen um eine semisynthetische Diät. Der Einfluß der Diätform auf das fremdstoffabbauende Enzymsystem ist aus mehreren Gründen von Wichtigkeit:

1. Ergebnisse des Fremdstoffmetabolismus aus verschiedenen Laboratorien werden allgemein verglichen. Diätetische Unterschiede und die daraus hervorgehenden Veränderungen in den Enzymaktivitäten sind sicherlich oft Gründe für diskrepante Ergebnisse (HIETANEN 1974).

2. Die aus den verschiedensten Gründen durchgeführten Induktionsversuche von Enzymsystemen können durch unterschiedliche Diätformen beträchtlich beeinflußt werden. WATTENBERG gibt 1971 an, daß allein durch diätetische Komponenten die Benzpyren-Hydroxylase im Dünndarm induzierbar ist. Der Induktionseffekt wird durch die diätetische Zusammensetzung sogar deutlich modifiziert WATTENBERG 1972).

3. Wird ein oral aufgenommener Fremdstoff durch intestinale Enzymsysteme metabolisiert, so kann die Aktivität dieser Enzyme die Menge an Stoff bestimmen, die umgewandelt oder unverändert die Blutbahn und damit ihr Wirkungskompartiment erreicht (PANTUCK 1976). Handelt es sich dabei um Medikamente, so können therapeutische Probleme die Folge sein. Dieser Effekt wird intestinale "first pass" Elimination genannt (LEOPOLD 1977).

4. Rohdiäten erhöhen nach Angaben mehrerer Autoren (WATTENBERG 1971, PANTUCK 1976, HOENSCH 1976) die Aktivität des fremdstoffabbauenden Enzymsystems oder von Teilen des Enzymsystems.

Dieser Effekt wird im Darm, jedoch nicht in der Leber beobachtet. Die erhöhte Aktivität kann eine Schutzfunktion gegen oral aufgenommene toxische oder karzinogene Substanzen darstellen, sie kann aber auch die Schadwirkung dieser Substanzen verstärken (HOENSCH 1976).

Als Nahrungsinhalte, die den intestinalen Metabolismus von Fremdstoffen stimulieren können, nennt LOUB 1975 Kohl, Spinat, Dill, Blumenkohl und in ganz besonderem Maße Rosenkohl. Diese enthalten als gemeinsame Inhaltsstoffe Flavone und Indole, die auch isoliert als Induktoren fungieren, jedoch ist noch nicht bewiesen, ob sie in den Rohdiäten die alleinigen Wirksubstanzen sind. Andere Diäten mit einem Überschuß an Fett, relativem Mangel an lipotropen Substanzen, Vitamin A oder Ballaststoffen alterieren nach CAMPBELL 1974 das Monooxygenase-System; dies führt zu Modifikationen in der experimentellen chemischen Karzinogenese (ROGERS 1975). Leberenzyme sind weit weniger diätabhängig (HIETANEN 1974). Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Fremdstoffe die Darmmukosa als erste Schwelle passieren müssen und bis sie zur Leber gelangen durch Umwandlung in der Darmwand schon einen großen Teil ihrer Wirkung verloren haben.

In dieser Arbeit wurde nur eine teilweise Reaktion des intestinalen Monooxygenase-Systems auf die verschiedenen Diäten gefunden. Bei Verfütterung der Rohdiät waren die Cytochrome P-450 und b_5 signifikant erhöht, EOD und Reduktase blieben unverändert. Auch die Naphthol-Glucuronyltransferase zeigte in ihrer Aktivität keine Unterschiede zwischen semisynthetischer- und Rohdiät. Eine Erklärung für das Konstantbleiben der Glucuronyltransferase liegt möglicherweise an ihrer Lokalisation in den tieferen Schichten des Membransystems (HIETANEN 1975).

Die Reduktaseaktivität zeigt beim Vergleich zwischen roher und semisynthetischer Nahrung keine Veränderungen. Dies steht in Übereinstimmung mit von HOENSCH 1976 berichteten Ergebnissen. Auffallend ist, daß beide Cytochromwerte erhöht sind, die EOD-Aktivität aber nicht.

Dieses Phänomen, daß die Enzyme unabhängig vom Cytochrom reagieren oder umgekehrt hat GAILLARD 1977 beschrieben. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß jedes der im Monooxygenase-System enthaltenen Cytochrome eine etwas verschiedene jedoch sich überlappende Substratspetifität besitzt (ULLRICH 1977) und somit das bestimmte Cytochrom nicht zwingend terminale Oxidase der gemessenen EOD sein muß. THOMAS konnte 1976 immunologisch nachweisen, daß in der Rattenleber sechs verschiedene Formen von Cytochrom P-450 existieren.

4.3. Verhalten der Enzyme bei Karzinogengabe

Dem Monooxygenase-System, als Bestandteil des Dünndarmepithels, kommt im Metabolismus von Fremdstoffen und damit auch von Karzinogenen eine wesentliche Bedeutung zu. Dabei kann die Umwandlung zum einen seine Schutzfunktion haben, zum anderen aber zu Schädigungen und damit eventuell zum Krebs führen. Welche dieser beiden Möglichkeiten dominiert ist ungewiß.

WATTENBERG nennt das Monooxygenase-System in seiner Arbeit 1972 einen "Überlebensmechanismus" in einer durch unzählige Noxen verunreinigten Umwelt. Seine Theorie stützt sich auf einige Arbeiten, die zeigten, daß ein Schutz gegen chemische Karzinogene durch Aktivitätserhöhung des mischfunktionellen Monooxygenase-Systems möglich ist. RICHARDSON beschrieb 1952, daß durch Gabe von Induktoren die Häufigkeit, an durch 3-Methyl-4-dimethyl-aminoazobenzol induzierbaren Lebertumoren zu erkranken, wesentlich erniedrigt war. Zu der gleichen Feststellung kam MILLER 1958 für Tumoren der Leber, der Mamma, des Gehörgangs und des Darmes bei Verfütterung von 2-Acethylamino-flouren und gleichzeitiger Induktion der Monooxygenasen. In weiteren Versuchen wurden diese Effekte auch für chemisch erzeugbare Dünndarm- und Blasentumoren beschrieben. Als Induktoren wurden meist polycyclische Kohlewasserstoffe, Flavone oder Phenothiazine verwendet. Weitere Hinweise für eine Beteiligung des Monooxygenase-Systems an der Erniedrigung der Karzinogenese gibt die Verfütterung von semisynthetischer Diät im Vergleich zu Rohdiät. Bei Rohdiät, die durch ihre natürlichen Inhalts-

stoffe zu einer Steigerung der Enzymaktivität führt, wird eine niedrigere Tumorinzidenz beobachtet (ROGERS 1975). Vitamin A Mangel, ein Überschuß an Fett und eine Erniedrigung der lipotropen Substanzen führen zu einer höheren Tumorrate.

Die fettreiche Diät bewirkt gleichzeitig eine Erniedrigung der intestinalen Monooxygenase-Aktivität (HIETANEN 1975).
Als Mechanismus wird diskutiert, daß sich die normale Struktur des endoplasmatischen Retikulums ändert und dadurch die Bindung der Fremdstoffe an das endoplasmatische Retikulum behindert wird (ROELS 1969). Zusammenfassend läßt sich folgern: Substanzen, die die Aktivität des Monooxygenase-Systems erhöhen, können die Tumorinzidenz durch chemische Karzinogene verändern.

Diese Reaktion des Monooxygenase-Sytems ist ein durchaus erwünschter Effekt, es darf aber nicht übersehen werden, daß zahlreiche Substanzen erst während des oxidativen Abbaus zu Produkten umgewandelt werden, die hochaktive Toxine oder Karzinogene darstellen. Schädigungen durch reaktionsfähige Zwischensubstanzen lassen sich nach ULLRICH 1977 im wesentlichen auf 4 Verbindungsklassen zurückführen: die N-Hydroxyverbindungen, die 1,2 Diphenole, die Epoxide und die Carbene. Trotz dieser Überlegungen wurden keine Ergebnisse mitgeteilt, die klar aussagen, daß durch Erhöhung der Monooxygenaseaktivität eine Steigerung der Karzinogenität eines chemischen Karzinogens in vivo beobachtet wurde (WATTENBERG 1974).

Ein Ansatz, die Funktion des Monooxygenase-Systems in der chemischen Karzinogenese näher zu untersuchen, ist eine differenzierte Betrachtung der Reaktionen seiner Komponenten bei oralen Karzinogengaben über die Zeit. Da sich einer Oxidation im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus noch eine Konjugation mit Glucuronsäure anschließen kann, erschien die Bestimmung der Nphtohol-Glucuronyltransferase ebenfalls sinnvoll. Aus dem zeitlichen Verlauf sind einige Abschnitte besonders hervorzuheben:

1. Der initiale Anstieg und der darauf folgende Abfall der intestinalen Enzymaktivität könnte durch einen Inhibitor-Effekt des DMH auf das Enzymsystem erklärt werden. Bestimmte Fremdstoffe z.B. α-Naphthoflavon wirken bei einer niedrigen Konzentration stimulierend auf die Enzymaktivität, bei höherer Konzentration tritt jedoch eine Enzymhemmung auf (STOHS 1976). Bei kontinuierlicher DMH-Fütterung könnte eine allmähliche Anhäufung des DMH im Körper der Ratte erfolgen und eine ansteigende Konzentration des Stoffes auftreten.

2. Anstieg der EOD-Aktivität am 4. und 5. Tag der Karzinogengabe: Biochemisch kann ein solcher Anstieg durch Induktion oder Aktivierung erfolgen. Für den Nachweis der Induktion wäre es notwendig die Proteinsyntheserate zu kennen, da die Messung des Gesamtproteingehalts nicht empfindlich genug ist. Eine Aktivierung über Konformationsänderung wäre in diesem Fall also ebenso denkbar. Innerhalb des Fremdstoffmetabolismus kann der Anstieg sowohl Indiz für die Initiierung eines Überlebensmechanismus als auch für eine Verstärkung der schädigenden Wirkung sein.

3. Am 7. Tag der deutliche Aktivitätsabfall von EOD, Naphthol-Glucuronyltransferase und Cytochrom P-450 unter den Normalbereich. Trotz dieser deutlichen Veränderungen bleibt der mikrosomale Proteingehalt gegenüber den Kontrolltieren gleich. Da auch histologische Untersuchungen der Dünndarmmukosa ohne pathologischen Befund blieben, lassen sich diese Aktivitätserniedrigungen nur durch eine Veränderung am Enzymprotein selbst oder an den Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums erklären. Für eine genauere strukturelle Analyse wären hier elektronenmikroskopische Untersuchungen nötig. Im Fremdstoffmetabolismus folgen diese Aktivitätserniedrigungen unmittelbar der erhöhten EOD-Aktivität. Dieser Ablauf könnte darauf hinweisen, daß durch die gesteigerte EOD-Aktivität auch vermehrt Schadstoffe gebildet werden können, die auf den Stoffwechsel negativ rückwirken.

4. Der kontinuierliche Anstieg des Cytochrom P-450 Gehaltes nach dem 7. Tag. Diese Reaktion der hier gemessenen Cytochrom P-450 Form könnte als Hinweis gewertet werden, daß möglicherweise ein anderes Enzym oder Enzymsystem durch DMH induziert wurde.

Reduktase und Cytochrom b_5 bleiben über den gesamten Versuchszeitraum unbeeinflußt. Beide stellen einen so substratunspezifischen Mechanismus der oxidativen Biotransformation dar, daß keine oder nur eine unmerkliche Anpassung an exogene Faktoren erfolgt.

Die Kontrolle des Allgemeinzustandes der Tiere hat ergeben: die Futteraufnahme der Versuchstiere war leicht reduziert und damit auch die Gewichtszunahme. Es konnte jedoch weder vom Verhalten noch von der Histologie des Darmgewebes auf intestinale Beschwerden geschlossen werden. Möglicherweise hat die DMH-Beimischung den Geschmack oder den Geruch des Futters für die Tiere unangenehm verändert.

Verbindet man die gefundenen Ergebnisse mit den in der Literatur vorgeschlagenen Hypothesen über die Funktion des Monooxygenase-Systems bei der Karzinogenese im Darm, so erscheinen zwei spekulative Annahmen möglich:

- DMH-Gaben steigern anfänglich die EOD-Aktivität. Fungiert diese Erhöhung als Schutzmechanismus, so wird DMH in unschädliche Produkte umgewandelt. Da DMH jedoch weiterhin kontinuierlich zugeführt wird, erreicht und überschreitet seine Konzentration einen Schwellenwert, bei dessen Überschreiten das Monooxygenase-System alteriert wird. Dann könnte das Karzinogen zum großen Teil unverändert den Dünndarm passieren. Infolge der langsameren Passage im Dickdarm ist die Kontaktzeit mit dem karzinogenen Agens länger, so daß hier die Schadstoffe ihre Wirkung entfalten können.

- Die durch DMH-Gaben erhöhte EOD-Aktivität steigert die Schadstoffproduktion. Die gebildeten Schadstoffe wirken als Hemmer auf das Monooxygenase-System zurück. Da durch die hemmende Wirkung wiederum weniger Schadstoffe produziert werden, pendelt das System in den Normalbereich zurück. Dies bedeutet aber, daß auf normalem Aktivitätsniveau die schädigende Wirkung durch das Monooxygenase-System kontinuierlich erhalten oder verstärkt wird. Die unterschiedliche Reaktion von Dünn- und Dickdarm müßte auch hier auf die Passagegeschwindigkeit zurückgeführt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der Dünndarmmukosa und im Lebergewebe von männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden Komponenten des mikrosomalen Monooxygenase-Systems und die Naphthol-Glucuronyltransferase bestimmt, sowie deren Reaktionen auf verschiedene Diätformen und auf orale Gaben des Darmkarzinogens DMH untersucht.

Rohdiät bewirkte im Vergleich zu einer semisynthetischen Diät eine signifikante Erhöhung des Gehaltes an Cytochrom P-450 und b_5 in Rattendünndarmmikrosomen. Die Enzyme 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase, NADPH-Cytochrom C-Reduktase und Naphthol-Glucuronyltransferase blieben unverändert.

Orale Gaben von DMH erhöhten vom 3. - 5. Tag im Dünndarm die Aktivität der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase auf etwa das Zweifache des Normalwertes, am 7. Tag der DMH-Fütterung fiel die Aktivität bis unter den Normbereich ab. Dieser Abfall konnte auch bei Naphtho-Glucuronyltransferase und Cytochrom P-450 beobachtet werden. Bei weiterer DMH-Gabe kehrten die Werte von 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase und Naphthol-Glucuronyltransferase wieder in den Normalbereich zurück; der Gehalt von Cytochrom P-450 nahm vom 7. zum 91. Fütterungstag zu. NADPH-Cytochrom C-Reduktase und Cytochrom b_5 zeigten unter DMH-Gaben keine Veränderungen. Ebenso blieb der mikrosomale Proteingehalt über den gesamten Versuchszeitraum konstant.

In der Leber wurden unter dem Einfluß von DMH ähnliche Veränderungen der 7-Äthoxycumarin-O-Dealkylase wie im Dünndarm beobachtet, die anderen Komponenten des mikrosomalen Enzymsystems wurden jedoch nicht beeinflußt.

Alle Tiere nahmen an Gewicht zu, die Versuchsgruppen aber deutlich weniger. Histologisch waren bei den DMH-Tieren in der Dünndarmmukosa weder Entzündungs- noch Malignitätszeichen zu erkennen.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß intestinale Karzinogene Veränderungen des Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenase-Systems des Rattendarms verursachen. Die initialen Enzymaktivierung und die spätere temporäre Depression könnten für eine DMH-induzierte Beeinflussung der intestinalen Monooxygenasen sprechen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abbot, V., Deloria, L., Günther, T., et al.
Comparison of hepatic microsomal drug-metabolizing systems from rats fed crude and purified diets.
Drug metabolism and disposition Vol. 4, No. 3, (1976), S. 215-222.

Ahmad, N., Black, M.
The hepatic microsomal mixed-function oxidase system in man: cofactor effects and the influence of cholestase.
The J. of Pharmacology and experimental Therapeutics Vol. 203, No. 2 (1977), S. 397-408.

Bock, K.W., Fröhling, W., Remmer, H., Rexer, B.
Effects of phenobarbital and 3-methylcholantrene on substrat specifity of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase.
Biochimica et Biophysica Acta 327 (1973), S. 46-56.

Bock, K.W., White, I.N.H.
UDP-glucuronyltransferase in perfused rat liver and in microsomes: influence of phenobarbital and 3-methylcholantrene.
Eur. J. Biochem. 46 (1974), S. 451-459.

Bray, G.A.
A simple efficient liquid scintillator for counting aqueanous solutions in a liquid scintillation counter.
Analyt. Biochem. 1 (1960), S. 279-285.

Calman, K.C.
Why are small bowel tumours rare? An experimental model.
Gut 15 (1974), S. 552-554.

Campbell, T.C., Hayes, I.R.
Role of nutrition in the drug-metabolizing enzyme-system.
Pharmacol. Rev. Vol. 26, No. 3 (1974), S. 171-197.

Carlson, P.
Lehrbuch der Biochemie.
8. Auflage, Thieme-Verlag, 1972.

Chhabra, R.S., Pohl, R.J., Fouts, J.R.
A comparative study of xenobiotic-metabolizing enzymes in liver and intestine of various animal species.
Drug metabolism and disposition Vol. 2, No. 5 (1974), S. 443-447.

El Defrawy, el Masry, S., Cohen, G.M., Mannering, G.J.
Sex-dependent differences in drug-metabolizing system of liver during sexual maturation.
Drug metabolism and disposition Vol. 2, No. 3 (1974), S. 267-278.

Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmäl, D.
Organotrope karzinogene Verbindungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Zeitschrift f. Krebsforschung 69 (1967), S. 103-201.

Eltze, M., Jung, A., Jackisch, R.
Cytoplasmatic changes in level and distribution of glucose-6-phosphatase activities from rat liver during diethyl-nitrosamine-induced carzinogenesis.
Chem.-Biol. Interactions 18 (1977), S. 295-308.

Gaillard, D., Chamoiseau, G., Derache, R.
Dietary effects on inhibition of rat hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a pesticide (Morestan).
Toxicology Vol. 8 (1977), S. 23-32.

Geigy
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage, 1968.

Günther, T., Mannering, G.J.
Induction of hepatic monooxygenase systems of pregnant rats with phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
Biochem. Pharmacol. Vol. 26 (1977), S. 577-584.

Hietanen, E., Hänninen, O.
Variable activities of drug-metabolizing enzymes in the gut of the rat after feeding with different pelleted diets.
Comp. Gen. Pharmac. Vol. 5 (1974), S. 255-259.

Hietanen, E., Laitinen, M., Vaino, H., Hänninen, O.
Dietary lipid induced changes in activities of drug-metabolizing enzymes in liver and duodenum of rat.
Lipids Vol. 10, No. 8 (1975), S. 467-471.

Hill, J.H.
Steroid nuclear dehydrogenation and colon cancer.
Am. J. Clin. Nutr. 27 (1974), S. 1475-1480.

Hoensch, H., Woo, C.H., Schmid, R.
Cytochrom P-450 and drug metabolism in intestinal villous and crypt cells of rats.
Biochem.Biophys.Res. Commun. 65 (1975), S. 399-406.

Hoensch, H., Woo, C.H., Raffin, S.B., Schmid, R.
Oxidative metabolism of foreign compounds in rat small intestine: cellular localisation and dependence on dietary iron.
Gastroenterology 70 (1976), S. 1063-1070.

Hoensch, H., Fleischmann, R.
Chemische Karzinogenese im Gastrointestinaltrakt.
DMW 102 (1977), S. 1516-1520.

Hollander, M., Wolfe, D.A.
Non-parametric statistical methods.
New York (1973), S. 67 ff.

Huber, E.
Dissertation, Universität Tübingen, 1978.

Jacobson, M., Levin, W., Poppers, P.J., Wood, A.W., Conney, A.H.
Comparison of the o-dealkylation of 7-ethoxycoumarine and the hydroxylation of benzopyrene in human placenta.
Clin. Pharmacology and Therapeutics 16 (1974), S. 701-710.

Josting, D., Winne, D., Bock, K.W.
Glucuronidation of paracetamol, morphine and 1-naphthol in the rat intestinal loop.
Biochem. Pharmacol. im Druck.

Knoll, R., Christ, W., Müller-Oerlinghausen, B., Coper, H.
Formation of chlorpromazine sulphoxide and monodesmethy-chlorpromazine by microsomes of small intestine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297 (1977), S. 195-200.

Kuenzig, W., Tkaczevski, V., Kamm, J.J., Conney, A.H., Burns, J.J.
The effect of ascorbic acid deficiency on extrahepatic microsomal metabolism of drugs and carcinogens in the guinea-pig.
J. of Pharmacology and experimental Therapeutcs, Vol. 201, No. 3 (1977), S. 527-533.

Lake, B.G., Hopkins, R., Chakraborty, J., Bridges, J.W., Parke, D.
The influence of some hepatic enzyme inducers and inhibitors on extrahepatic drug metabolism.
Drug metabolism and disposition Vol. 1, No. 1 (1973), S. 342-349.

Laquer, G.L., Mickelsen, O., Whithing, M.G.
Carcinogenic properties of nuts from cycas circinalis.
J. Nat. Cancer Inst. 31 (1963), S. 919.

Loub, W.D., Wattenberg, L.W., Dawis, D.W.
Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occuring indoles of cruciferous plants.
J. Nat. Cancer Inst. Vol. 54, Nr. 4 (1975), S.985-988.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J.
Proteinmeasurement with the folin phenol reagenz.
J. Biol. Chem. 193 (1951), S. 205-215.

Miller, E.C.
On the protective action of certain polycyclic aromatic hydrocarbons against carzinogenesis by aminoazo- and 2-acetylamino-flourene.
Cancer Res. 18 (1958), S.469-475.

Netter, K.J., Seidel, G.
An adaptively stimulated o-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 146 (1964), S. 61-65.

Omura, T., Sato, R.
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. of Biol. Chem. Vol. 239, No. 7 (1964), S. 2379-2385.

Pantuck, E.J., Hsiao, K.C., Loub, W.D., Wattenberg, L.W., et al.
Stimulatory effect of vegetabels on intestinal drug metabolism in the rat.
J. Pharmacol, Exp. Ther. 198, No. 2 (1976), S. 278-283.

Parkasch, O.
Statistical and ethiologic aspects of carzinoma of the large intestine.
Digestion 11 (1974), S. 115-127.

Phillips, R.L.
Role of life style and dietary habits in risks of cancer among seventh-day adventists.
Cancer Res. 35 (1975), S. 3513-3522.

Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Wynder, E.L.
Effects of dietary fat level and dimethylhydrazine on fecal acid and neutral sterol excretion and colon carzinogenesis in rats.
J. nat. Cancer Inst. 52 (1974), S. 507-511.

Remmer, H.
Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle durch Pharmaka.
DMW Vol. 92, No. 44 (1967), S. 2001-2008.

Richardson, H.L., et al.
Tumorinhibition and adrenal histology responses in rats in which 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzol and 20-methyl-cholanthrene were simultaneously administered.
Cancer Res. 12 (1952), S. 356.

Rifkind, A.B., Bennet, S., Forster, E.S., New, M.J.
Compounds of the heme biosynthetiy pathway and mixed function oxidase activity in human fetal tissues.
Biochem. Pharmacol. Vol. 24 (1975), S. 839-846.

Roels, O.A., Anderson, O.R., Shan, O.O., Trout, M.E.
Vitamin A and membranes.
Am. J. Clin. Nutr. 22 (1969), S. 1020-1032.

Rogers, A.E., Newborne, P.M.
Dietary enhancement of intestinal carzinogenesis by dimethyl-hydrazine in rats.
Nature Vol. 246, No. 5434 (1973), S. 491-492.

Rogers, A.E., Newborne, P.M.
Dietary effects on chemical carzinogenesis in animal models for colon and liver tumors.
Cancer Res. 35 (1975), S. 3427-3431.

Rotter, W.
Lehrbuch der Pathologie Bd. 1, Schattauer Verlag 1975.

Schmid, A.
Dissertation in Vorbereitung, 1978.

Stohs, S.J., Grafström, R.C., Burke, M.D., Orrenius, S., Moldéus, P.W.
The isolation of rat intestinal microsomes with stable P-450 and their metabolism of benzopyrene.
Arch. Biochem. Biophys. 177 (1976), S. 105-116.

Takesue, Y., Sato, R.
Enzyme distribution in subcellular fractions of intestinal mucosal cells.
J. Biochem. Vol. 64, No. 6 (1968), S. 873-883.

Thomas, P.E., et al.
Immunochemical evidence for 6 forms of rat liver cytochrom P-450 obtained using antibodies against purified rat liver cytochroms P-450 and P-448.
Mol. Pharma. Vol. 12 (1976), S. 746.

Toth, B.
Synthetic and naturally occuring hydrazines as possible cancer causativ agents.
Cancer Res. 35 (1975), S. 3693-3697.

Tredger, J.M., Chhabra, R.S., Fouts, L.R.
Postnatal development of mixed-function oxidation as measured in microsomes from the small intestine and liver of rabbits.
Drug metabolism and disposition Vol. 4, No. 1 (1976), S. 17-23.

Ullrich, V., Weber, P.
The o-desalkylation of 7-ethoxycoumarine by liver microsomes.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. Bd. 353 (1972), S. 1171-1177.

Ullrich, V.
Die Rolle des Cytochrom P-450 bei der Aktivierung von Pharmaka.
Drug Res. 27 (II) 9b (1977), S. 1821-1828.

Uotilla, P., Marniemi, J.
Variable effects of cigarette smoking in aryl hydrocarbon hydroxylase, epoxide hydratase, UDP-glucuronyltransferase activities in rat lung, kidney and small intestine mucosa.
Biochem. Pharmacol. Vol. 25 (1976), S. 2323-2328.

Ward, J.M., Yamamoto, R.S., Brown, C.A.
Pathology of intestinal neoplasms and other lesions in rats exposed to azoxymethane.
J. Nat. Cancer Inst. Vol. 51, No. 3 (1973), S. 1029-1035.

Wattenberg, L.W.
Studies of polycyclic hydrocarbon hydroxylases of the intestine possibly related to cancer.
Cancer Vol. 28, No. 1 (1971), S. 99-102.

Wattenberg, L.W..
Dietary modification of intestinal and pulmonary aryl hydrocarbon hydroxylase activity.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23 (1972), S. 741-748.

Wattenberg, L.W.
Potential inhibitors of colon carzinogenesis.
Digestive Diseases Vol. 19, No. 10 (1974), S. 947-953.

Wiebecke, B., Krey, U., Löhrs, U., Eder, M.
Morphological and autoradiographical investigations on experimental carzinogenesis and polyp development in the intestinal tracts of rats and mice.
Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. 360 (1973), S. 179-193.

Williams, H.C., Kamin, J. and H.
Microsomal triphosphopyridine nucleotide cytochrom C reduktase of liver.
J. Biol. Chem. 237 (1962), S. 587-595.

Lebenslauf

Name:	Aigner-Hötte Edith, geb. Aigner
Geboren:	8. November 1950 in Heidenheim/Brenz
Eltern:	Aigner Willy, selbständiger Unternehmer Aigner Ruth, geb. Widenmann, Hausfrau
Familienstand:	verheiratet mit Josef Hötte, wiss. Angestellter
Kinder:	keine
Volksschule:	1957 - 1961 Bergschule Heidenheim/Brenz
Gymnasium:	1961 - 1969 Hellenstein-Gymnasium Heidenheim/Brenz
Abitur:	20. Juli 1969
1. Studium:	WS 1969 - SS 1974 Ernährungswissenschaft an der Universität Hohenheim
Studienabschluß:	8. Oktober 1974 als Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
2. Studium:	seit WS 1974 Studium der Human-Medizin an den Universitäten Hohenheim und Tübingen
Staatsexamen:	28. April 1980